

Medizinische Fakultät der Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Physiologie

**Die Bedeutung von Oxidoreduktasen des
Endoplasmatischen Retikulums für
Strahlensensitivität und Überleben kultivierter
kolorektaler Tumorzellen**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Philip Eric Kranz

aus Münster

2017

Dekan: Prof. Dr. med. Jan Buer

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Eric Metzen

2. Gutachter: Prof. Dr. Jens Siveke

3. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Thews (Halle (Saale))

Tag der mündlichen Prüfung: 19.03.2018

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	5
1.1 DAS KOLOREKTALE KARZINOM	5
1.1.1 Definition	5
1.1.2 Pathophysiologie.....	5
1.1.3 Klassifikation.....	5
1.1.4 Metastasierung.....	6
1.1.5 Therapie	6
1.2 DAS ENDOPLASMATISCHE RETIKULUM (ER)	7
1.2.1 Physiologische Funktionen	7
1.2.2 Proteinfaltung im ER.....	7
1.2.3 Qualitätskontrolle im ER.....	8
1.2.4 ER assoziierte Degradation (ERAD).....	9
1.3 ER-STRESS UND KOMPENSATIONSMECHANISMEN (UNFOLDED PROTEIN RESPONSE)	10
1.3.1 ER-Stress, Auslösende Faktoren und Konsequenzen	10
1.3.2 ATF6.....	11
1.3.3 IRE1	11
1.3.4 PERK.....	12
1.3.5 p53 und Apoptose.....	13
1.4 ER-OXIDOREDUKTASEN	14
1.4.1 Allgemeines	14
1.4.2 ERp57.....	14
1.4.3 PDI.....	17
1.4.4 Andere wichtige ER-Oxidoreduktasen	20
1.5 DAS ER IN MALIGNOMEN	21
1.5.1 Allgemeines	21
1.5.2 UPR in der Tumorentwicklung, –progression und -therapie	21
1.6 ZIEL DER STUDIE	23
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 REAGENZIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	24
2.2 GERÄTE	24
2.3 PUFFER UND MEDIEN	24
2.4 ANTIBIOTIKA FÜR PLASMID-SELEKTION	27
2.5 BAKTERIENSTÄMME	27
2.6 EUKARYOTISCHE ZELLINIEN.....	28
2.7 shRNA, esiRNA, siRNA, PLASMIDE UND PCR-PRIMER.....	28
2.8 ANTIKÖRPER	30
2.9 ZELLKULTUR	31
2.9.1 Zellkulturbedingungen für eukaryotische Zelllinien.....	31
2.9.2 Kältekonservierung für eukaryotische Zelllinien	31
2.9.3 Transfektion von Zellkulturen	31
2.9.4 Lentivirus-Produktion	31
2.9.5 Lentivirale Transduktion und Generierung von stabilen Knockdown- (KD) und Doppel-Knockdown-Zelllinien (DK)	32
2.9.6 KD-Induktion.....	32
2.9.7 Bestrahlung	32
2.9.8 Behandlung mit chemischen Inhibitoren	32
2.9.9 MTT-Zellviabilitätsassay.....	33
2.9.10 Koloniebildungstest.....	33
2.10 PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG.....	34
2.11 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	34
2.12 WESTERN BLOT	34
2.13 MALEIMID-ASSAY	34
2.14 AUSWERTUNG TRANSIENTER TRANSFEKTIONEN MIT FLUORESZIERENDEN FUSIONSPROTEINEN	35
2.15 RNA-ISOLATION, REVERSE TRANSKRIPTION UND POLYMERASE-KETTENREAKTION	35
2.16 TRANSFORMATION VON KOMPETENTEN BAKTERIEN.....	36
2.17 PLASMID-DNA-ISOLATION.....	36
2.18 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	36

2.19	CASPASE-3 ENZYM-AKTIVITÄTS-ASSAY	37
2.20	ZELLZYKLUS-ANALYSE	37
2.21	LUZIFERASE-ASSAY	37
2.22	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	38
3.	ERGEBNISSE	39
3.1	FUNKTIONSWEISE DES INDUZIERBAREN LENTIVIRALEN TET-PLKO-PURO SYSTEMS UND GENERIERUNG DER KNOCKDOWN-ZELLINIEN.....	39
3.2	DEPLETION VON ERP57 UND PDI UND IHR EINFLUSS AUF DIE APOPTOSE UNTER IONISIERENDER BESTRAHLUNG.....	41
3.3	DIE ROLLE VON P53 IN DER INITIATION DER APOPTOSE NACH DEPLETION VON ERP57 UND PDI.....	43
3.4	ZELLVIABILITÄT UND ZELLZYKLUS	44
3.5	KLONOGENES ÜBERLEBEN.....	45
3.6	ATF6-AKTIVITÄT IN HCT116 DK-ZELLEN	47
3.7	IRE1 IN HCT116 DK-ZELLEN	48
3.8	PERK-AKTIVITÄT IN HCT116 DK-ZELLEN	49
3.9	VERGLEICH VON PDI shRNA UND PDI siRNA	51
3.10	PROAPOPTOTISCHE FUNKTION VON PDI	52
3.11	DER REDOXSTATUS VON PDI UND PERK-AKTIVIERUNG	54
3.12	DIE ROLLE VON PDI IN DER PERK-AKTIVIERUNG UNTER GLOBALEM ER-STRESS.....	55
4.	DISKUSSION	58
5.	ZUSAMMENFASSUNG	68
6.	LITERATUR.....	69
7.	ANHANG.....	81
7.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	81
7.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	84
7.3	PUBLIKATIONSLISTE	85
7.4	ERKLÄRUNG	86
7.5	DANKSAGUNG.....	87
7.6	LEBENS LAUF.....	88

1. Einleitung

1.1 Das Kolorektale Karzinom

1.1.1 Definition

Das Kolonkarzinom ist die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache sowohl bei Männern als auch bei Frauen. Der Großteil der kolorektalen Tumoren tritt nach dem 50. Lebensjahr auf (90 %). Erkrankungen vor dem 40. Lebensjahr sind möglich, aber selten und häufig durch genetische Ursachen bedingt. Im Jahr 2014 verstarben in Deutschland etwa 25.000 Patienten an einem kolorektalen Karzinom.

Man unterscheidet das Risiko der Normalbevölkerung und das der Risikogruppen, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Für die Normalbevölkerung, älter als 40 Jahre, beträgt das Risiko etwa 6 %. Zu den Risikogruppen zählen zum einen Patienten mit kolorektalen Adenomen, zum anderen Patienten mit einer familiären Disposition wie der HNPCC (hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom, Lynch Syndrom), FAP (familiäre adenomatöse Polyposis) oder Colitis ulcerosa (Herold, 2016).

1.1.2 Pathophysiologie

Die meisten kolorektalen Karzinome entstehen auf dem Boden von intraepithelialen Neoplasien in Form von Adenomen (70-80 %, sogenannte Adenom/Dysplasie Karzinom Sequenz). Hierbei liegt eine Mutation des APC-Gens (*Adenomatous-polyposis-coli*) vor. Die Transformation vom Normalgewebe, über Adenome, bis hin zum Karzinom dauert ca. 10 Jahre.

Die übrigen 30 % der Tumore entstehen über den serratierten Karzinogeneseweg auf der Basis von Kolonpolypen. Hier liegen die Mutationen in den Genen, die für BRAF (*B-Raf proto-oncogene*) und KRAS (*V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) kodieren (Herold, 2016).

1.1.3 Klassifikation

Die Klassifikation der kolorektalen Tumore erfolgt über die TNM/UICC (Tumor, Nodus, Metastasen/ Union internationale contre le cancer) Klassifikation und beruht auf der

Infiltrationstiefe, der lymphogenen sowie der hämatogenen Metastasierung des Tumors. Histologisch liegt fast immer ein Adenokarzinom vor.

1.1.4 Metastasierung

Die lymphogene Metastasierung erfolgt abhängig von der Lokalisation des Tumors im Kolon bzw. Rektum. Hohe Rektumtumore metastasieren in die paraaortalen Lymphknoten, mittlere zusätzlich in die Beckenwand und tiefe Rektumtumore zusätzlich in die inguinalen Lymphknoten. Kolontumore metastasieren lymphogen in die mesenterialen und von dort aus weiter bis in die paraaortalen Lymphknoten.

Die hämatogene Metastasierung erfolgt zunächst in die Leber und anschließend in die Lunge. Tiefe Rektumtumore können auf Grund ihres Abflussweges direkt in die Lunge metastasieren (Herold, 2016).

1.1.5 Therapie

Bei auf die inneren Schichten der Darmwand begrenzten Tumoren, können endoskopische Verfahren eingesetzt werden. Die Therapie der Wahl beim lokalisierten und nicht metastasiertem Kolon- oder Rektumtumor besteht in der chirurgischen R0-Resektion unter Mitnahme der abführenden Lymphbahnen. Einzelne Leber- oder Lungenmetastasen können ebenfalls chirurgisch therapiert werden (Herold, 2016).

Bei Rektumkarzinomen ab UICC-Stadium II-III wird eine prä- (neoadjuvante) sowie postoperative (adjuvante) Radiochemotherapie mit 5-Fluoruracil empfohlen, die ein besseres operatives Outcome verspricht (Herold, 2016).

Adjuvante Therapien kommen beim Kolonkarzinom erst ab UICC-Stadium III zum Einsatz.

Insgesamt sind die Therapiemöglichkeiten im fortgeschrittenen Stadium jedoch begrenzt, sodass häufig nur noch palliative Therapieregime eingesetzt werden können (z.B. Anus praeter Anlage bei stenosierend wachsendem Tumor).

Die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei UICC Stadium I bei 95 %, II bei 85 %, III bei 65 % und IV bei 5 % (Herold, 2016).

1.2 Das Endoplasmatische Retikulum (ER)

1.2.1 Physiologische Funktionen

Das Endoplasmatische Retikulum erfüllt in eu- und prokaryotischen Zellen zahlreiche physiologische Funktionen. Es dient z.B. als Calcium-Speicher in glatter sowie quergestreifter Muskulatur und ist essenziell für ihre Kontraktionsfähigkeit. Die Synthese von Lipiden und Membranen ist im glatten ER lokalisiert. Eine weitere Funktion ist die Proteinsynthese, Proteinfaltung und Qualitätskontrolle, die im und am rauen ER stattfindet. Sekretorische Proteine werden am rauen ER translatiert, in das ER-Lumen transportiert und dort durch Oxidoreduktasen, Lektine und Chaperone in ihre richtige Konformation gefaltet. Des Weiteren erfolgt eine Qualitätskontrolle der nativen Proteine, bevor sie weiter Richtung Golgi-Apparat oder zu ihrem Funktionsort transportiert werden. Fehlgefaltete Proteine werden mittels ERAD (*ER associated degradation*) aussortiert und schließlich im Zytosol abgebaut (Ellgaard & Helenius, 2003).

1.2.2 Proteinfaltung im ER

Das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums ist optimiert für Proteinsynthese und -faltung. Das Milieu unterscheidet sich durch Ionenkonzentration (zB. Calcium), Redoxeigenschaften und Proteinzusammensetzung von anderen zellulären Kompartimenten. Modifikationen wie Disulfidbrückenbildung, N-Glykosylierung und Glycophosphatidylinosit-Anker sind posttranslationale Veränderungen, die nur im ER gebildet werden und der besonderen Zusammensetzung dieses Organells geschuldet sind. Etwa 30-50 % aller synthetisierten Proteine der Zelle werden im ER gefaltet und modifiziert (Wang & Kaufman, 2014).

Die Synthese und Faltung eines Proteins läuft vereinfacht in 3 Schritten ab (s. Abb. 1):

1. Translation und Translokation von Proteinen mit Signalpeptid vom Zytosol ins ER durch den Translokon-Komplex d.h. durch einen Kanal, durch den die neu synthetisierte Aminosäurekette hindurch ins ER transportiert wird.
2. Abspaltung des Signalpeptids durch Peptidasen, Glykosylierung mit Glucose (Glc), Mannose (Man), N-Acetylglukosamin (Glc1Man7-9GlcNAc2) sowie posttranslationale Faltung durch ER Chaperone, Lektine und Oxidoreduktasen.
3. Oligomere Zusammensetzung bei korrekter Faltung der Untereinheiten (Ellgaard & Helenius, 2003).

1.2.3 Qualitätskontrolle im ER

Eine Qualitätskontrolle während und nach der komplexen Faltung und posttranslationalen Modifikation ist aus mehreren Gründen wichtig. Zum einen wird verhindert, dass unzureichend gefaltete oder modifizierte Proteine aus dem ER weitertransportiert werden und der Zelle aufgrund ihrer Toxizität schaden. Des Weiteren erlaubt die Retention von fehlerhaften Proteinen einen erneuten Faltungsversuch durch ER-ständige Enzyme, was den Prozess energieeffizienter gestaltet. Außerdem ist es von großer Bedeutung, dass z.B. fehlerhafte Ionenkanäle nicht in die Zellmembran eingebaut werden und das physiologische Gleichgewicht der Zelle stören.

Man unterscheidet eine primäre von einer sekundären Qualitätskontrolle. Bei der primären Qualitätskontrolle stützt sich die Zelle auf biophysikalische (z.B. hydrophil, hydrophob, Aggregate) und strukturelle Eigenschaften (Primär-, Sekundär-, Tertiär-, Quartärstruktur) der nativen Proteine. Die primäre Qualitätskontrolle erfolgt durch Proteine wie BiP (*Immunoglobulin heavy chain-binding protein*), GRP94 (*Glucose regulated protein 94 kDa*), Calnexin, Calreticulin, ERp57 (*Protein disulfide isomerase family A member 3*) und PDI (*Protein disulfide isomerase family A member 1*). Schon bei kleinster Abweichung in der Konformation eines nativen Proteins binden sie dieses und verhindern einen Weitertransport Richtung Golgi-Apparat (Fra et al., 1993; Hellman et al., 1999).

Der sogenannte Calnexin/Calreticulin-Zyklus gehört ebenfalls zur primären Qualitätskontrolle. Das membrangebundene Calnexin sowie das lösliche Homolog Calreticulin, binden die durch Glykosyltransferasen angehängten monoglucosylierten Glycane (Glc1Man7-9GlcNAc2) der neu synthetisierten Proteine. Calnexin und Calreticulin formen transiente Komplexe mit ER-Oxidoreduktasen wie ERp57 und PDI und bringen das Protein durch den Einbau intramolekularer Disulfidbrücken in die richtige Konformation. Das neu synthetisierte Protein bleibt solange gebunden, bis die Glucosidase II die Glucose des Zuckerrückgrats abspaltet (Man7-9GlcNAc2). Ist das Protein richtig gefaltet, kann es das ER nun verlassen, stimmt die Konformation nicht, kann über das Enzym UGGT (*UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase*) erneut ein Glucosemolekül angehängt werden und das Protein damit ein weiteres Mal in den Faltungszyklus eintreten. Dieser Kreislauf läuft solange ab, bis das Protein richtig gefaltet wurde und das ER verlässt, oder es der Degradation zugeführt wird (Braakman & Hebert, 2013).

Zur sekundären Qualitätskontrolle zählen viele unterschiedliche, selektive Mechanismen für Proteinfamilien bzw. einzelne Proteine. Es existieren spezifische Merkmale an den nativen Proteinen, die durch verschiedene ER-Enzyme erkannt werden. Diese Mechanismen sind oft

zelltypspezifisch und variieren von Spezies zu Spezies. Die beteiligten Proteine sind häufig zusätzlich in der Regulation von Transportsystemen innerhalb der Zelle beteiligt und nicht unbedingt ER-ständig (Herrmann et al., 1999).

Dennoch existieren Enzyme, die bei fast allen sekretorischen Proteinen notwendig sind, um das ER Richtung Golgi-Apparat oder Zellmembran zu verlassen. Dazu gehört z.B. *ninaA* (*rhodopsin-specific isozyme*), eine Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerase, die die Transportfähigkeit von Rhodopsin in *Drosophila melanogaster* sicherstellt und für die visuelle Transduktion entscheidend ist (Stamnes et al., 1991).

Ein Beispiel für einen dieser komplexen Mechanismen ist die Regulation der Cholesterol Synthese: Zelluläre Cholesterolspiegel werden durch den Export vom SREBP (*sterol regulatory element binding protein*) aus dem ER reguliert. Dieser hängt von der Cholesterol-abhängigen Bindung mit dem Begleitprotein SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*) ab. Bindet Cholesterol an SCAP, findet eine Konformationsänderung im SCAP-SREBP-Komplex statt, der einen Export ins Zytosol verhindert. Dieser Export findet mit Hilfe der beiden Transmembranproteine INSIG 1 und 2 (*Insulin-induced gene 1 und 2*) statt, die ebenfalls an den SCAP-SREBP-Komplex binden. So wird verhindert, dass bei ohnehin hohen Cholesterolspiegeln weiter Cholesterol produziert wird (Steck & Lange, 2002; Yabe et al., 2002; Yang et al., 2002).

1.2.4 ER assoziierte Degradation (ERAD)

Trotz des oben beschriebenen Faltungsapparates und der umfassenden Qualitätskontrolle, können nicht alle neu synthetisierten Proteine korrekt gefaltet werden. Die fehlerhaft gefalteten Proteine werden dann dem ERAD System zugeführt.

Zunächst werden fehlerhafte Proteine durch z.B. Calnexin, Calreticulin und PDIs auf Grund ihres verkürzten Mannoserückgrats (Man0-7Glc2NAc) oder fehlerhafter Strukturen erkannt und gebunden. Unter ATP-Verbrauch werden die fehlgefalteten Proteine zurück ins Zytosol verbracht, die genaue Aufgabe der daran beteiligten Proteine wie des Cdc48/p97-Komplexes (*Transitional endoplasmic reticulum ATPase*) ist nicht vollständig geklärt. Im Zytosol werden die fehlgefalteten Proteine durch eine E3-Ligase ubiquitiniert. Ubiquitinierte Proteine werden sowohl von der 19S-, als auch der 26S-Proteasom-Untereinheit erkannt und durch das Proteasom letztlich in ihre Aminosäuren zerlegt (s. Abb. 1) (Vembar & Brodsky, 2008).

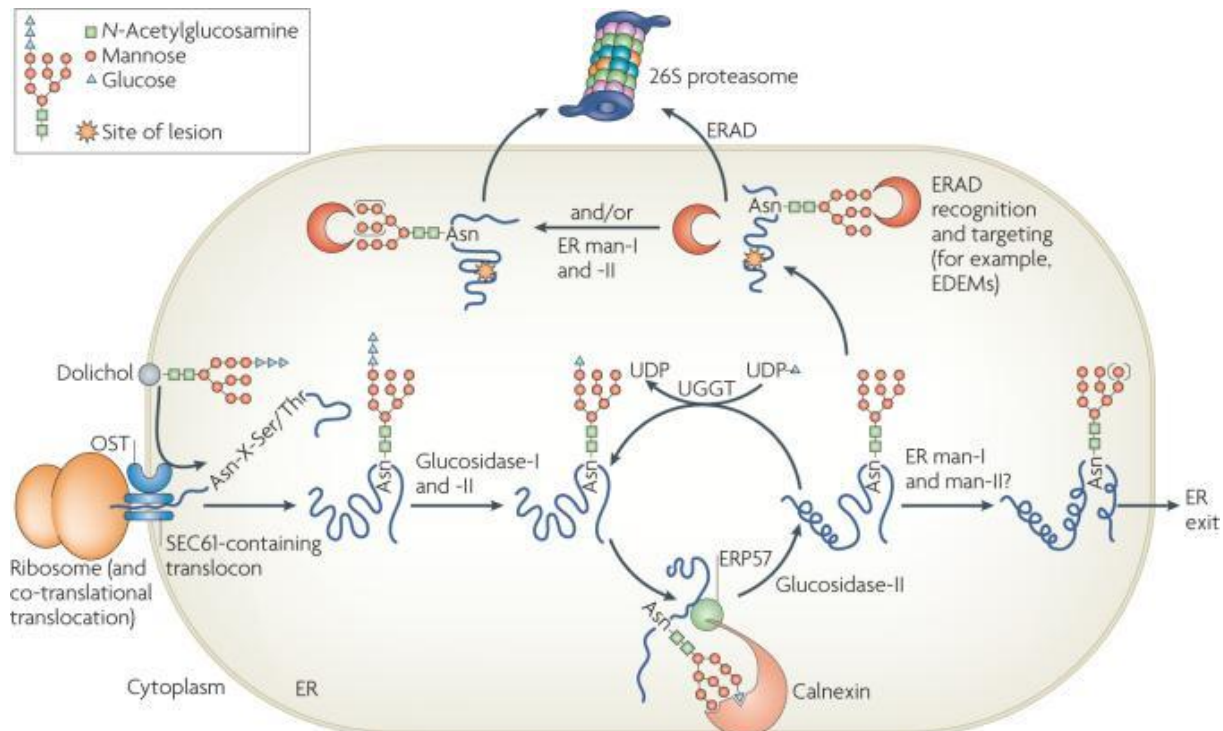


Abbildung 1: Proteinfaltung und der Calnexin/Calreticulin-Zyklus im ER (Vembar & Brodsky, 2008)

1.3 ER-Stress und Kompensationsmechanismen (Unfolded Protein Response)

1.3.1 ER-Stress, Auslösende Faktoren und Konsequenzen

Die oben beschriebenen Faltungs- und Qualitätskontrollmechanismen besitzen eine gewisse Kapazitätsgrenze. Wird diese überschritten, greift ein evolutionär konservierter Prozess ein, der den Stress innerhalb des ERs reduziert und der Zelle die Möglichkeit verschafft, sich an die neuen Bedingungen anzupassen. Gelingt dies nicht, sind Sensoren in der Lage den Zelltod einzuleiten (Kim et al., 2006).

Die Stimuli, die Stress im ER auslösen, sind vielfältig. Hierunter fallen Nährstoffmangel, Hypoxie, genetische Defekte, Chemotherapeutika, Entzündungen, Infektionen, ionisierende Strahlung, fetale Entwicklung, Karzinogenese und sporadische DNA- und RNA-Schädigungen. All diese Beeinflussungen der Zelle führen direkt oder indirekt zu einer Überladung des ERs mit nativen Proteinen, die auf Grund von fehlenden Ressourcen oder fehlender Energie (Nährstoffmangel, Hypoxie, hoher sekretorischer Aufwand), fehlerhaften Aminosäureketten (sporadische DNA- und RNA-Schädigungen, ionisierende Strahlung, Karzinogenese, genetische Defekte) oder Schädigung des Faltungsapparates selbst (Chemotherapeutika, ionisierende Strahlung) nicht zu bewältigen ist (Rutkowski & Kaufman, 2004).

Es werden drei Arme der sogenannten Unfolded Protein Response (UPR) unterschieden, die in solchen Situationen als Sensoren und Kompensationsmechanismen aktiviert werden. Hierzu zählen ATF6 (*activating transcription factor 6*), IRE1 (*Inositol-requiring enzyme 1*) und PERK (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*). Diese drei Sensoren sind in ungestressten Zellen an BiP gebunden. Fallen ungefaltete Proteine an, löst BiP sich von den Sensoren, um die ungefalteten Proteine über seine Chaperonaktivität zu binden (s. Abb. 2). Dies führt zur Aktivierung von ATF6, PERK und IRE1 (Dufey et al., 2014).

1.3.2 ATF6

Das Glycoprotein ATF6 gehört zu den Typ II Transmembranproteinen und wird unter ER-Stress zum Golgi-Apparat transportiert, wo es durch *site-1* und *site-2* Proteasen gespalten wird. Der zytosolische Teil fungiert anschließend als Transkriptionsfaktor im Nukleus und reguliert verschiedene Gene des ERAD- und Faltungssystems (z.B. BiP, GRP94, PDI), um die Homöostase im ER wiederherzustellen. ATF6 bildet Heterodimere mit XBP1 (*X-box binding protein 1*) und anderen Transkriptionsfaktoren wie CREB (*cAMP response element-binding protein*) und PCAF (*P300/CBP-associated factor*) und kann so die Expression einer großen Bandbreite von Genen beeinflussen (Dufey et al., 2014; Haze et al., 1999).

1.3.3 IRE1

IRE1 hat zwei katalytische Funktionen: zum einen eine Serin/Threonin Kinase-Funktion, zum anderen eine Endoribonuklease Aktivität, wobei beide auf der zytosolischen Seite der ER Membran lokalisiert sind. In Situationen von ER-Stress autophosphoryliert sich IRE1 und bildet Homodimere, was zu einer Konformationsänderung und Aktivierung der Ribonuklease-Domäne führt. Diese Ribonuklease Aktivität schneidet aus der XBP1-mRNA ein 26 bp (Basenpaare) langes Stück heraus, welches das Ableseraster (*reading frame*) verändert. Diese mRNA kodiert nun für den potenten Transkriptionsfaktor XBP1 (Calfon et al., 2002), welcher an der Genregulation von ER Chaperonen, ERAD Komponenten und der Synthese von Phospholipiden beteiligt ist (Rutkowski et al., 2008).

Die Ribonuklease spaltet des Weiteren mRNAs, die für sekretorische Proteine kodieren und limitiert so das Proteinaufkommen im ER. Dieser Mechanismus wird als RIDD (*regulated IRE1 dependent decay*) bezeichnet. Zusätzlich wird hierüber das Aufkommen von bestimmten microRNAs reguliert, die eng mit Apoptoseinduktion und Energiemetabolismus verknüpft sind (Upton et al., 2012).

Darüber hinaus interagiert aktiviertes IRE1 mit anderen klassischen Stress-Stoffwechselwegen wie z.B. JNK (*c-jun NH2-terminal kinase*), p38 (*p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen*) oder NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) (Hu et al., 2006; Kaneko et al., 2003; Nguyen et al., 2004).

1.3.4 PERK

PERK ist ein Typ I Transmembranprotein mit einer zytosolischen Kinase-Domäne und einer NH₂-luminalen-Domäne, die ER-Stress detektiert. Bei der PERK-Aktivierung durch ER-Stress kommt es zu einer Autophosphorylierung und Dimerisierung bzw. Oligomerisierung. Diese PERK-Dimere und -Oligomere sind nun in der Lage, zytosolische Proteine zu phosphorylieren und damit Signale an andere Zellkompartimente zu schicken. Zu den Phosphorylierungs-Zielen gehört eIF2α (*elongation initiation factor 2α*) an Serin 51. Dies führt zu einer Inaktivierung von eIF2α und damit zu einer geringeren Proteintranslation, wodurch die Überladung des ERs mit Faltungsintermediaten reduziert wird (Harding et al., 2000).

Es existieren jedoch mRNAs, die auf Grund eines sogenannten 5' *open reading frames* nach der eIF2α-Phosphorylierung präferiert translatiert werden. Dazu gehört unter anderem ATF4 (*activating transcription factor 4*), ein Transkriptionsfaktor, der im Nukleus verschiedene UPR Zielgene aktiviert, die für eine bessere Versorgung mit Aminosäuren, Antioxidantien und Faltungsproteinen sorgen und die Apoptose regulieren. Zwei wichtige Zielgene von ATF4 sind CHOP (*C/EBP homologous protein*) und GADD34 (*growth arrest and DNA damage 34*). Unter prolongiertem ER-Stress agiert GADD34 als Gegenspieler von PERK und führt zur Dephosphorylierung von eIF2α (Novoa et al., 2001). CHOP agiert selbst als Transkriptionsfaktor und löst durch Suppression von Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*) sowie Hochregulation von BIM (*Bcl-2-like protein 11*) Apoptose aus (Dufey et al., 2014; McCullough et al., 2001).

Gut die Hälfte der PERK-abhängigen Zielgene sind jedoch ATF4 unabhängig. Weitere Faktoren wie NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor*), der Antioxidantsfaktoren reguliert und der Einfluss von PERK auf NFκB, sind noch nicht vollständig aufgeklärt (Dufey et al., 2014).

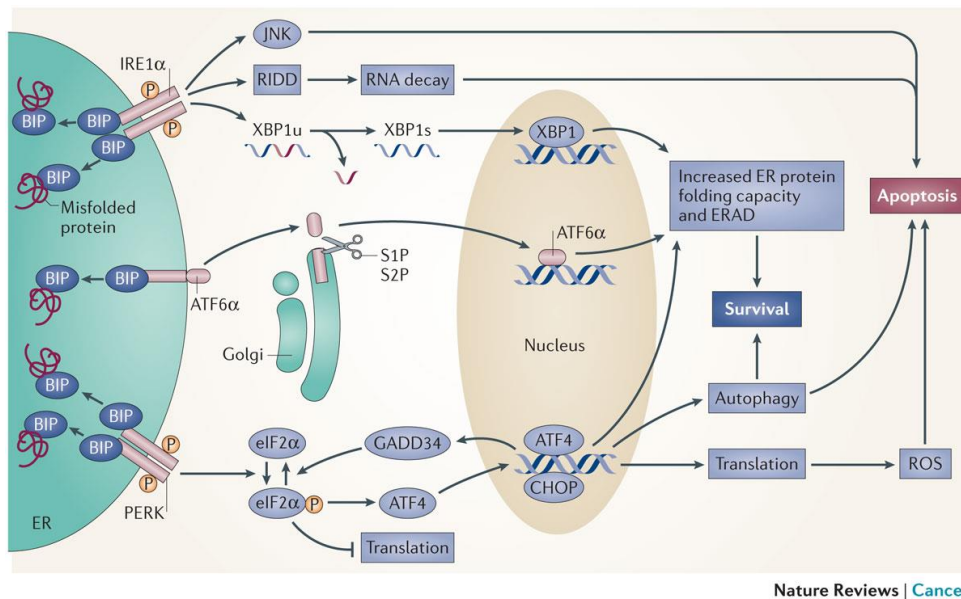


Abbildung 2: Die UPR in schematischer Übersicht (Wang & Kaufman, 2014).

1.3.5 p53 und Apoptose

Prolongierter ER-Stress, der nicht kompensiert werden kann, führt zur Aktivierung von proapoptotischen Signalkaskaden. Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist ein Mechanismus, um fehlerhafte, kranke oder überflüssige Zellen geordnet zu eliminieren. Apoptose geht mit einer Ablösung von Umgebungsstrukturen, einer Abrundung der Zelle, Bildung und Sekretion von Membranbläschen (*Blebbing*, Apoptotische Körper), Proteinexport aus Mitochondrien und Fragmentation der DNA und des ERs einher (Saraste, 1999).

Eine wichtige Rolle spielen dabei Caspasen: In gesunden Zellen liegen sie als inaktive Procaspasen ohne oder mit nur geringer Protease-Aktivität vor. Alle Stimuli, die Apoptose auslösen, aktivieren über teils unterschiedliche Wege letztendlich die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7, die für einen Großteil der Proteolyse verantwortlich sind (Taylor et al., 2008).

p53 ist der bekannteste und am besten untersuchte Tumorsuppressor in menschlichen Zellen. Kommt es zur DNA-Schädigung oder anderweitigem zellulären Stress, wird das instabile p53 (Halbwertszeit ca. 30 min) posttranslational durch Phosphorylierung an unterschiedlichen Domänen stabilisiert. Der Transkriptionsfaktor gelangt nun in den Nukleus, wo er Gene des Zellzyklus (z.B. *p21*), der DNA-Reparatur oder der Apoptose (z.B. *BAX* (*bcl-2-like protein 4*), *BAK* (*Bcl-2 homologous antagonist killer*), *PUMA* (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), *Bim*) stimuliert. In vielen malignen Tumoren ist der Tumorsuppressor p53 mutiert und trägt damit zur Progression und zum ungehemmten Wachstum trotz DNA-Schäden bei (Fridman & Lowe, 2003).

Einige Studien konnten zeigen, dass unter prolongiertem ER-Stress nicht nur die oben beschriebenen proapoptotischen Gene wie CHOP durch ATF4 hochreguliert werden, sondern auch p53 über die Transkriptionssteigerung von PUMA zur Apoptose unter ER-Stress beiträgt. Zellen, die p53 depletiert sind, zeigen daher eine höhere Resistenz gegenüber chemischen ER-Stressoren (Giorgi et al., 2015; Li et al., 2006; Lin et al., 2012).

1.4 ER-Oxidoreduktasen

1.4.1 Allgemeines

Zu den ER-Oxidoreduktasen zählt eine große Proteinfamilie mit mehr als 20 bekannten Mitgliedern. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Reduktion, Oxidation und Isomerisation von Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten neu synthetisierter Proteine im ER. Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Aufgaben dieser Proteine jedoch weitreichender sind, und dass das zelluläre Vorkommen nicht nur auf das ER beschränkt ist. Oxidoreduktasen wurden in verschiedenen Studien im Zytoplasma, Zellkern und an der Zellmembran gefunden, wo ihre Aufgaben weniger klar beschrieben sind (Aureli et al., 2013; Chichiarelli et al., 2010; Grindel et al., 2011; Wong et al., 2017).

1.4.2 ERp57

Das Gen PDIA3 ist auf Chromosom 15 lokalisiert und kodiert für das 505 Aminosäuren lange Protein ERp57. Die ersten 24 Aminosäuren sind das sogenannte Signalpeptid, welches die Lokalisation in das ER ermöglicht und anschließend abgespalten wird. Strukturell besteht ERp57 aus insgesamt 4 Domänen, *a*, *b*, *b'* und *a'* (s. Abb. 3) (Ferrari & Söling, 1999; Kozlov et al., 2010). Jede dieser 4 Domänen enthält ein Thioredoxin-ähnliches Faltungsmotiv mit abwechselnden alpha-Helices und beta-Faltblatt Struktur. Zusätzlich enthalten die erste und die vierte Domäne (*a* und *a'*) je einen Thioredoxin-aktiven Abschnitt mit der Aminosäuresequenz *cys-gly-his-cys*, welche für die Redoxaktivität von ERp57 verantwortlich ist. C-terminal besitzt ERp57 ein ER-Retentions Motiv (*QEDL*) und ein potenzielles nukleäres Lokalisationssignal. In kristallographischen Studien sowie durch die Analogie zu PDI zeigt sich, dass ERp57 eine U-förmige Struktur einnimmt, bei der sich die Thioredoxin-aktiven terminalen Domänen *a* und *a'* auf den Schenkeln des U nahekommen und zusammen mit anderen Proteinen interagieren können. Die *b*- und *b'*-Domäne verbinden *a* und *a'* miteinander und werden für die volle Aktivität von ERp57 benötigt. Zusätzlich befinden sich hier die Bindungsstellen für Calnexin und Calreticulin (Silvennoinen et al.,

2004). Dies ist ein Unterschied zwischen PDI und ERp57. Die b'-Domäne von PDI zeigt keine Affinität zu Calnexin oder Calreticulin. Dort befinden sich die größten strukturellen Unterschiede zwischen PDI und ERp57. ERp57 benötigt für die katalytische Aktivität im Calnexin/Calreticulin-Zyklus Calreticulin als Bindungspartner, PDI hingegen nicht (Kozlov et al., 2010; Turano et al., 2011).

Es wurden mehrere posttranslationale Veränderungen an ERp57 entdeckt (z.B. Phosphorylierungen an Tyrosin Resten, Formierung von Dimeren und Polymeren), die biologische Funktion ist jedoch nicht geklärt (Donella-Deana et al., 1996; Kita et al., 2006).

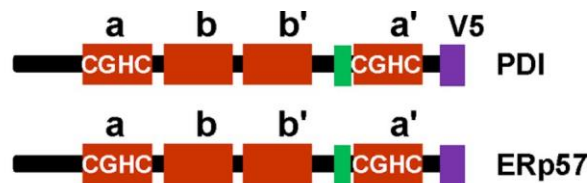


Abbildung 3: Schematische Struktur der Oxidoreduktasen PDI und ERp57. Modifiziert nach (Flaumenhaft & Furie, 2016).

Zu den zellbiologischen Funktionen von ERp57 sind in den letzten Jahren mehrere, zum Teil diskrepante Studien anderer Arbeitsgruppen publiziert worden, die im Folgenden zusammengefasst werden. Im ER ist ERp57 an der Bildung von Disulfidbrücken innerhalb neu synthetisierter Proteine beteiligt. Diese Aktivität benötigt die Bindung an Calreticulin oder Calnexin, welche die nativen monoglykosylierten Proteine erkennen (Oliver et al., 1997). Der Disulfid-Bildungsprozess beginnt mit einer gemischten Disulfidbrücke zwischen einer aktiven Thioredoxin-Domäne in ERp57 und dem nativen Glykoprotein. Für die Vervollständigung der Disulfidbrücke wird nun das zweite, distal gelegene Cystein in dem Thioredoxin aktiven Abschnitt von ERp57 benötigt. Mutationsanalysen bei denen das distale Cystein entfernt wurde, konnten zeigen, dass hierdurch die gemischte Disulfidbrücke stabilisiert wird (sogenannte *Trap-Mutante*) (Molinari & Helenius, 1999; Oliver et al., 1997). Eine weitere wichtige Funktion von ERp57 besteht in der Zusammensetzung des MHC1-Komplexes (*Major Histocompatibility Complex I*), wo es in den schweren Ketten die Disulfidbrückenbindungen katalysiert und zur Formation des *Peptide-loading*-Komplex beiträgt (Lindquist et al., 1998).

ERp57 ist des Weiteren in der Regulation der SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase*) involviert. ERp57 kontrolliert und verändert den Redoxstatus der luminalen Thiole und damit die Aktivität der SERCA (Li & Camacho, 2004).

Proteomische Analysen ergaben, dass ERp57 in Phagosomen präsent ist, was höchstwahrscheinlich für die Erkennung und anschließende Beladung von MHC1-Komplexen bei der Immunantwort wichtig ist (Turano et al., 2011).

Mehrere Studien konnten zeigen, dass ERp57 ebenfalls auf der Zelloberfläche präsent ist und von manchen Zellen sogar nach extrazellulär sezerniert wird, obwohl ein C-terminales ER-Retentionsmotiv vorhanden ist. Eine gut beschriebene Funktion von ERp57 auf der Zelloberfläche ist die Fusion von Spermien mit der Eizelle durch Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen (Ellerman et al., 2006).

Auf der Zelloberfläche bindet ERp57 an aktives Vitamin D3, was zu schnellen, nicht genomischen Prozessen (Aktivierung von *Phospholipase C* und *A2*, *Protein kinase C*, *Extracellular response Kinase*) und einer sofortigen Internalisierung sowie dem nukleären Import von ERp57 führt. Diese Prozesse sind wichtig für den Phosphatmetabolismus, die Antitumoraktivität in Brustkrebszellen bei ERp57-Knockdown und Knochenmineralisation (Chen et al., 2010; Nemere et al., 2004).

Außerdem ist ERp57 notwendig für den Export von Calreticulin aus dem ER zur Zellmembran, wo Calreticulin als Erkennungsmerkmal für immunogenen Zelltod agiert (Obeid, 2008; Panaretakis et al., 2008).

Im Zytosol bindet ERp57 an den mTOR-Komplex (*mechanistic Target of Rapamycin*). mTOR existiert in 2 Formen, dem mTOR-Komplex 1 und 2. ERp57 agiert hauptsächlich mit mTOR-Komplex 1, welcher aus mTOR, Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*) und mLST8 (*MTOR associated protein, LST8 homolog*) besteht. Dieser Komplex ist in der Lage, verschiedene Proteine ((4E-BP1 (*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*), SGK1 (*Serine/threonine-protein kinase Sgk1*)) zu phosphorylieren und damit Proteinsynthese und Zellwachstum zu regulieren (Sarbasov & Sabatini, 2005). ERp57 aktiviert in diesem Komplex die Kinaseaktivität von mTOR und ist an der Erkennung von Signalen wie Insulinpräsenz oder Nährstoffsituation beteiligt. Passenderweise stimuliert ERp57-Überexpression die Proliferation, während ERp57-Knockdown diese blockiert. Zumindest in Teilen kann hierfür die Interaktion zwischen mTOR und ERp57 verantwortlich gemacht werden (Husmann et al., 2015; Ramirez-Rangel et al., 2011).

Mehrere Arbeitsgruppen haben publiziert, dass ERp57 entweder zum Teil im Zellkern lokalisiert ist oder Effekte im Zellkern auslöst. In unserem Labor konnten wir in einer vorhergehenden Studie jedoch keine Kernlokalisation von ERp57 in HEK293T, HCT116 und MDA-MB-231 Zellen nachweisen (Husmann et al., 2015). Im Gegensatz dazu wurde

berichtet, dass ERp57 mit DNA interagiert, wenn die Zellen mit UV-Strahlen, Formaldehyd oder cis-Platin behandelt werden (Coppari et al., 2002; Eufemi et al., 2004).

ERp57 ist in einem Komplex mit verschiedenen Faktoren (HMBG1 + 2 (*High-Mobility-Group-Protein B1* + 2), HSC70, GAPDH (*glyceraldehyde 3 dehydrogenase*)) an der Erkennung von modifizierten Nukleosiden in der DNA beteiligt und verantwortlich für den daraus resultierenden genotoxischen Stress. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass ERp57 für die Phosphorylierung des Histons H2Ax unter genotoxischem Stress essenziell ist (Krynetskaia et al., 2009; Krynetski et al., 2003).

Überexpression von ERp57 wurde mit der Resistenz von Ovarialkarzinomzellen gegenüber Paclitaxel in Verbindung gebracht. Interaktion mit TUBB3 (*tubulin beta-3 chain*) und beta-Aktin waren für die Resistenzentwicklung entscheidend (Cicchillitti et al., 2010; Cicchillitti et al., 2009).

Auch *in vitro* bindet ERp57 DNA, wenn auch mit geringerer Affinität als Transkriptionsfaktoren. ERp57 interagiert über die α' -Domäne mit DNA, jedoch muss ERp57 hierfür in oxidiertem Form vorliegen. Es ist wahrscheinlich, dass ERp57 weniger selbst als Transkriptionsfaktor dient, sondern Transkriptionsfaktoren im korrekten Redoxstatus hält und für die Bildung von DNA-Bindungskomplexen benötigt wird (Ferraro et al., 1999; Grillo et al., 2002; Grillo et al., 2007).

Mehrere Publikationen beschreiben eine Interaktion von ERp57 mit dem Transkriptionsfaktor STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten. Ein Verlust von ERp57 führt zu einer geringeren Expression von STAT3 Zielgenen und impliziert damit eine gewisse Abhängigkeit (Chichiarelli et al., 2010). Jedoch existiert kein Konsens über die genaue Funktion, Interaktion und Lokalisation der Interaktion dieser beiden Proteine (Turano et al., 2011).

1.4.3 PDI

Ebenso wie ERp57 besteht PDI aus vier Thioredoxin-artigen-Domänen a, b, b' und a'. In der a- und a'-Domäne befinden sich die enzymatisch aktiven Thioredoxinmotive CXXC, verbunden werden diese durch die b- und b'-Domäne (s. Abb. 3). Zwischen b' und a' liegt der sogenannte X-linker, in dem der größte strukturelle Unterschied zwischen ERp57 und PDI lokalisiert ist und der für die unterschiedliche Substrataffinität der beiden Oxidoreduktasen verantwortlich ist (s. 1.4.2) (Freedman et al., 1998; Kemmink et al., 1997). Die Chaperon-Aktivität von PDI geht von der b'-Domäne aus. Neue Erkenntnisse zeigen, dass PDI *in vivo*

als Dimer vorliegen kann und diese Interaktion zwischen b- und b'-Domänen stattfindet (Bastos-Aristizabal et al., 2014). PDI ist in der Lage zwischen ungefalteten, teilweise gefalteten und vollständig gefalteten Proteinen zu unterscheiden, was für die Proteinfaltung und Qualitätskontrolle von immenser Bedeutung ist (Irvine et al., 2014).

Die Chaperonaktivität hängt nach neuesten Erkenntnissen vom Redoxstatus ab: Liegt PDI reduziert vor, zeigt sich eine geschlossener Konformation und damit eine geringere Chaperonaktivität. Oxidiertes PDI hingegen zeigt eine offener Konformation und kann daher mit höherer Wahrscheinlichkeit Substrate binden (Wang et al., 2013; Wang et al., 2012a).

Die katalysierten Redoxreaktionen laufen ähnlich ab, wie bei dem Proteinhomolog ERp57: Eine oxidierte a-Domäne katalysiert die Oxidation von zwei Thiolresten im Klientenprotein und wird dabei selber reduziert. Das N-terminale Cystein von PDI bildet dabei die gemischte Disulfidbrücke mit dem Substrat, während das C-terminale letztlich für die Ablösung des Substrats von PDI verantwortlich ist. Die a-Domäne wird dann von der a'-Domäne zurück in die oxidierte Form gebracht, sodass erneut ein Substrat oxidiert werden kann. Die nun reduzierte a'-Domäne muss wiederum von dem Protein ERO1 (*ERO1-like protein alpha*) zurückoxidiert werden, welches in dieser Reaktion aus O_2 H_2O_2 generiert (s. Abb. 4) (Araki et al., 2013; Araki & Nagata, 2011; Walker & Gilbert, 1997).

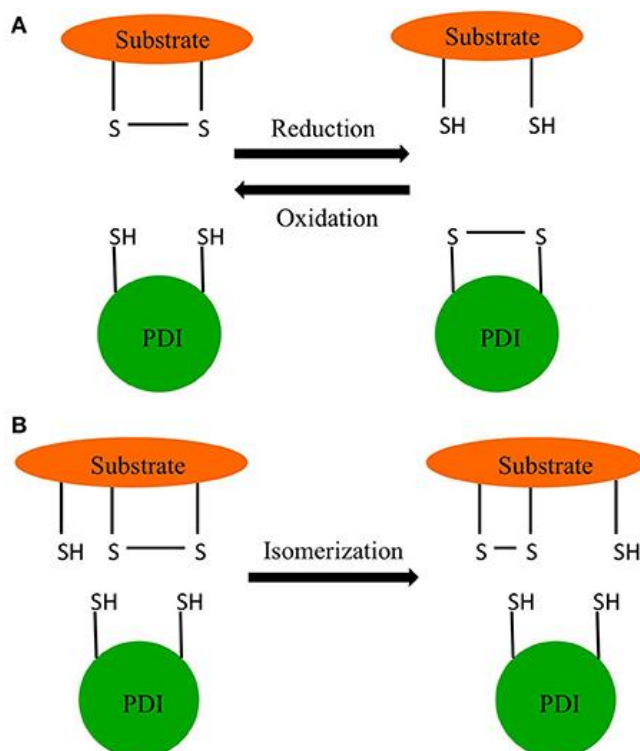


Abbildung 4: Katalytische Aktivität von PDI. A) Oxidation und Reduktion B) Isomerisation (Ali Khan & Mutus, 2014)

Die NADPH (*Nicotinamidadenindinukleotidphosphat*) Oxidase ist der größte Produzent von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS = *Reactive Oxygen Species*) in der Zelle (Ali Khan & Mutus, 2014). PDI reguliert über seinen Chaperonmechanismus die Expression sowie Aktivität der NADPH-Oxidase. Interaktionen zwischen diesen beiden Proteinen konnten sowohl im Zytosol, als auch im ER nachgewiesen werden. In Makrophagen ist PDI für den Anstieg von ROS über die NADPH-Oxidase mitverantwortlich. Oxidiertes PDI stimuliert die ROS Produktion, während reduziertes PDI diese bremst (Laurindo et al., 2012).

PDI ist ebenfalls in der Phagozytose von Pathogenen involviert (Ali Khan & Mutus, 2014). Darüber hinaus reduziert PDI zusammen mit Thioredoxin 1 Disulfide im HIV (Humanes Immundefizienz-Virus) Protein gp120, was zur Internalisierung in die Zelle beiträgt (Reiser et al., 2012).

Neue Untersuchungen konnten zeigen, dass PDI eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung spielt. Thrombozyten ohne PDI zeigen eine inadäquate Aggregation, die durch Zugabe von Wildtyp PDI reversibel ist. Pathophysiologisch wird dies auf cysteinreiche Integrinrezeptoren zurückgeführt, die durch die Redoxaktivität von PDI moduliert werden (Kim et al., 2013). In Endothelzellen lässt sich durch PDI-Depletion auf der Zelloberfläche die Blutgerinnung steigern, die Zugabe von exogenem PDI verringert diesen Effekt (Popescu et al., 2010).

Proteinablagerungen im zentralen Nervensystem (ZNS) konnten für viele Erkrankungen wie Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), bestimmte Formen von Demenz und Ischämien verantwortlich gemacht werden. PDI verringert diese Ablagerungen und ist daher ein interessantes zukünftiges Ziel für Therapieansätze. Ischämien und andere Erkrankungen führen im ZNS zu einer gesteigerten NO-Synthese (*Nitric oxide*), welche wiederum die enzymatische Aktivität von PDI durch S-Nitrosylierungen blockiert. Es folgt die Akkumulation von toxischen Proteinaggregaten wie z.B. von SOD1 (*Superoxide dismutase 1*), die zum Zelluntergang führen. Eine Blockierung der NO-Produktion verhindert die Bildung von SNO-PDI sowie von Proteinaggregaten, den gleichen Effekt zeigt eine PDI-Überexpression in diesen Zellen (Chen et al., 2012).

Aufgrund der wachsenden Erkenntnisse über die physiologischen und pathophysiologischen Rollen von PDI, wurden vermehrt Anstrengungen unternommen, PDI-Inhibitoren zu generieren. Der erste Inhibitor der gegen PDI eingesetzt wurde, ist das Antibiotikum Bacitracin, das jedoch nur eine geringe Substratspezifität zeigt und für das viele Nebenwirkungen beschrieben sind. Darüber hinaus hemmt Bacitracin vor allem die Chaperonaktivität durch Bindung an die b'-Domäne und lässt die Oxidoreduktase Aktivität

intakt (Dickerhof et al., 2011). Quercetin-3-rutinosid inhibiert ebenfalls PDI und wurde als Therapieoption zur Thrombozytenaggregationshemmung vorgeschlagen (Jasuja et al., 2012). *Propynoic acid carbamoyl methyl amide* (PACMA) ist ein irreversibler PDI-Inhibitor und wirkt, indem er an die Cysteine im aktiven Zentrum bindet und damit die Oxidoreduktaseaktivität blockiert (Xu et al., 2012).

1.4.4 Andere wichtige ER-Oxidoreduktasen

ERp46 (*Thioredoxin domain-containing protein 5*) enthält drei Thioredoxin-aktive-Domänen und dient als Stressüberlebensfaktor und schützt Zellen vor Apoptose. Hauptsächlich wird ERp46 in Endothelzellen und pankreatischen beta-Zellen exprimiert (Okumura et al., 2015).

ERp27 (*Endoplasmic reticulum resident protein 27*) findet sich vor allem in Niere, Lunge und Pankreas, seine physiologische Funktion ist bislang nicht vollständig geklärt. Es besteht aus zwei katalytisch inaktiven Thioredoxin-Domänen b und b'. Obwohl ERp27 selbst nicht an der Bildung von Disulfiden beteiligt ist, transportiert es Klientenproteine zu anderen Oxidoreduktasen (Okumura et al., 2015).

ERdj5 (*DnaJ homolog subfamily C member 10*) ist mit 90 kDa das größte Protein der PDI Familie und fungiert als Disulfid-Reduktase zusammen mit EDEM1 (*ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1*) und BiP im Rahmen des ERAD Systems (Okumura et al., 2015).

ERp44 (*Endoplasmic reticulum resident protein 44*) spielt eine Rolle in der intrazellulären Verteilung von ER Enzymen und in der Qualitätskontrolle von Proteinen mit multiplen Untereinheiten im frühen sekretorischen Stoffwechselweg (u.a. IgM, Adiponectin) (Okumura et al., 2015).

Neue Studien konnten zeigen, dass bestimmte Oxidoreduktasen nicht nur an der Faltung von Proteinen, sondern auch an der Feinregulation von Beginn, Dauer und Stärke der UPR beteiligt sind. ATF6 liegt in ungestressten Zellen als Homodimer vor, bei dem die Untereinheiten über Disulfidbrücken an Cys 467 und 618 gebunden sind. Unter ER-Stress werden die Disulfidbrücken gespalten und der entstehende, monomere zytosolische Teil wird zum Golgi-Apparat transportiert. Dieser Prozess ist abhängig von der Oxidoreduktase PDIA5 (*Protein disulfide-isomerase A5*) (Higa et al., 2014; Nakanaka et al., 2007). Ähnliches konnte auch für den ER-Stress Sensor IRE1 mit der Oxidoreduktase PDIA6 (*Protein disulfide-isomerase A6*) gezeigt werden: Depletion von PDIA6 führt zu einer Verlängerung und stärkeren Aktivität von IRE1 und Hypersensitivität gegenüber chemischer ER-Stress-Induktion. Die genaue Funktion und Modulation der intramolekularen Disulfidbrücken

in IRE1 und PERK durch Oxidoreduktasen ist jedoch noch unklar (Eletto et al., 2014). Einen Anhalt für die physiologische Relevanz geben jedoch verschiedene Studien, die z.B. zeigen, dass PDIA5 über die Regulation von ATF6 essenziell für Chemotherapieresistenz in Leukämiezellen ist (Higa et al., 2014).

1.5 Das ER in Malignomen

1.5.1 Allgemeines

Das ER und die UPR sind wichtige Faktoren in fast allen neurodegenerativen Erkrankungen und in jeder Stufe der Tumorentwicklung und –progression (Koumenis, 2006; Penaranda Fajardo et al., 2016; Scheper & Hoozemans, 2015; Yadav et al., 2014). Tumorzellen sind auf Grund ihrer hohen Proliferationsrate und unphysiologischen Blutversorgung mit stressreichen Kondition wie Hypoxie, Nährstoffmangel, hohem sekretorischen Aufwand und DNA-Aberrationen konfrontiert. Onkogene wie cMyc (*Myc proto-oncogene protein*) und HRAS (*HRas proto-oncogene*) führen darüber hinaus zu einer gesteigerten Proteinsynthese, die ebenfalls zu einer Überladung des ERs führt. Hämatologische Tumore, wie z.B. das Multiple Myelom, produzieren hohe Mengen an Antikörpern, dessen Export und Faltung nur durch ausreichende Ressourcen im ER gewährleistet werden kann. Viele Studien konnten nachweisen, dass Tumorzellen in diesen Situationen die UPR nutzen, um ihre Zellhomöostase und damit ihr Überleben und den Progress des Tumors zu wahren. Nichtsdestotrotz kann langanhaltender ER-Stress auch zum Zelltod führen (s. 1.3). Der Nutzen und Schaden einer UPR-Aktivierung hängt daher auch immer von der Art des Tumors, des Tumorsprungs, den individuellen Stresskonditionen und externen Faktoren wie Chemotherapiebehandlung ab (Wang & Kaufman, 2014).

1.5.2 UPR in der Tumorentwicklung, –progression und -therapie

PERK-Depletion führt zu einem verzögerten Auftreten von Her2Neu (*human epidermal growth factor receptor 2*) abhängigen Mamma-Karzinomen und verringert deren Metastasierung. Jedoch führt eine länger andauernde PERK-Suppression zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von spontan auftretenden Mamma-Karzinomen durch höhere genetische Instabilität (Bobrovnikova-Marjon et al., 2010). Auch die PERK-Effektoren wie ATF4 und CHOP scheinen sowohl als Tumorsuppressor, als auch in der Tumorprogression, z.B. durch

Induktion von Autophagie (ein Recyclingprozess für Proteine und Zellorganellen s. (Parzych & Klionsky, 2014)), eine Rolle zu spielen (Huber et al., 2013; Wang & Kaufman, 2014).

IRE1 wurde ausführlich im Kontext des multiplen Myeloms untersucht. B-Zellen benötigen für ihre Differenzierung in Plasmazellen das IRE1 Zielgen XBP1. Hohe XBP1 Proteinspiegel sind eng verknüpft mit dem Multiplen Myelom (Iwakoshi et al., 2003; Reimold et al., 2001; Wang & Kaufman, 2014; Zhang et al., 2005)

ATF6 wird mit dem Auftreten von hepatozellulären Karzinomen in Verbindung gebracht. Das ATF6-Zielgen BiP wird von vielen Krebszellen auf der Zelloberfläche präsentiert und korreliert mit hoher Proliferationsrate, schlechtem Therapieansprechen und schlechter Prognose (Arai et al., 2006; Arap et al., 2004; Lee, 2007; Wu et al., 2014).

Therapien wie Chemotherapeutika und Bestrahlung können die UPR auslösen oder modulieren und dadurch den Zelltod auslösen. Die Funktionen der UPR sind allerdings vielfältig, eine weitere Aktivierung kann ebenso einen Überlebensvorteil für die Krebszelle bieten. Sowohl eine zu hohe, als auch zu niedrige Aktivität kann zum Zelltod führen (Wang & Kaufman, 2014).

Die bekannteste und klinisch seit Jahren erprobte Behandlung vom multiplen Myelom zeigt eine erfolgreiche Interferenz der UPR mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib (Velcade®). Durch den hohen sekretorischen Aufwand fallen hohe Mengen an Proteinen für den Abbau am Proteasom an. Wird dieses durch Bortezomib inhibiert, sterben die Zellen durch Apoptoseinduktion ab. Die Wirksamkeit hängt dabei direkt von der Masse an produzierten Antikörpern ab. Interessanterweise konnten XBP1- und IRE1-Mutationen in Patientenproben mit Multiplem Myelom festgestellt werden, die mit einer Resistenz gegenüber Proteaseinhibitoren wie Bortezomib einhergehen (Carrasco et al., 2007; Hong & Hagen, 2013; Leung-Hagesteijn et al., 2013).

Vorklinische Studien zeigen darüber hinaus die Wirksamkeit von PERK-Inhibitoren wie GSK2656157 auf das Tumorstadium und die Mikroumgebung (Atkins et al., 2013).

Auch die Inhibition von ER-Oxidoreduktasen scheint antitumorös wirksam zu sein. So konnte gezeigt werden, dass der spezifische PDI-Inhibitor PACMA31 die Tumorstadium von Ovarialkarzinomen in Xenograft-Modellen signifikant reduziert (Xu et al., 2012). Unsere Arbeitsgruppe konnte Ähnliches für die Oxidoreduktase ERp57 *in vitro* feststellen (Husmann et al., 2015).

Nichtsdestotrotz sind weitere Studien für das Verständnis der molekularen Abläufe im komplexen System der Proteinfaltung und Regulation der Stressantworten von Nöten, um in

Zukunft die Indikation und den Nutzen eines therapeutisches Eingreifens abschätzen zu können (Wang & Kaufman, 2014).

1.6 Ziel der Studie

Solide Tumore sind nach wie vor die zweithäufigste Todesursache in den Industrienationen. Die Entwicklung neuer und effizienter Behandlungsstrategien ist daher unerlässlich, um die Mortalität dieser Erkrankungen in Zukunft senken zu können.

Das Endoplasmatische Retikulum spielt in Tumorzellen eine zentrale Rolle in der Produktion, Prozessierung und im Export von Proteinen, Rezeptoren, Enzymen und Liganden. Diese Proteine übernehmen essenzielle Funktionen der sogenannten „*Hallmarks of cancer*“ (Hanahan & Weinberg, 2011) wie Proliferation (u.a. EGF (*epidermal growth factor*), IGF1 (*Insulin-like growth factor I*)), Metastasierung (u.a. MMPs (*Matrix metalloproteinase*), Kollagenasen), Angiogenese (u.a. VEGF (*Vascular endothelial growth factor*)) und verminderter Zelltod durch Modulation des Immunsystems (u.a. MHC1).

Viele dieser Effektormoleküle enthalten Disulfidbrücken, die im ER durch Oxidoreduktasen oxidiert, isomerisiert oder reduziert werden müssen, um die Struktur und damit letztlich die Funktionalität der Proteine sicher zu stellen. Krebszellen sind daher besonders auf eine hohe ER-Kapazität angewiesen und Interventionen im ER-Faltungsapparat sind eine rationale Angriffsmöglichkeit, um den Progress des Tumors zu begrenzen.

Eine vorangegangene Studie (Hussmann et al., 2015) konnte nachweisen, dass der KD von ERp57, eine ER-Oxidoreduktase, in unterschiedlichen Zelllinien eine starke Antitumor-Aktivität aufweist.

In dieser Studie soll zusätzlich zur Depletion von ERp57 die ER-Oxidoreduktase PDI in der humanen kolorektalen Karzinom Zelllinie HCT116 ausgeschaltet werden. Aufgrund der hohen Homologie und ähnlichen Substratspektra beider ER-Oxidoreduktasen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch eine Kombinationsinhibition ein zusätzliche Toxizität bei der Behandlung von Krebszellen erreicht werden könne.

Ziel dabei ist die weitere Sensitivierung der Krebszellen auf ionisierende Strahlen, eine höhere Apoptoserate, verminderte Proliferation und die Darstellung der molekularen Abläufe.

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Enzyme und Reagenzien, die in dieser Studie verwendet wurden, entsprechen p.a. Qualität. Geräte und Reagenzien, die nicht gesondert erwähnt sind, entsprechen den üblichen Laborstandards.

2.2 Geräte

Tabelle 1: Technische Geräte, die in dieser Studie genutzt wurden

Gerät	Hersteller
Epoch Multifunktions Lesegerät	Biotek (Winooski, Vermont, USA)
FACS Canto II	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
FLx800 Fluoreszenz Lesegerät	Biotek
Fusion-FX7 Chemilumineszenz Detektionsgerät	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Laser Scan Mikroskop Zeiss LSM510	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Turner Design TD-20/20 Luminometer	Turner Design (Sunnyvale, Kalifornien, USA)

2.3 Puffer und Medien

Verwendete Puffer und Medien sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Puffer und Medien

Name	Bestandteile	Konzentration
Caspase-Lysepuffer	Tris (pH 7.3) NaCl NP-40	50 mM 150 mM 1 % (v/v)
Caspase-Substratpuffer	HEPES (2—ethansulfonsäure) (pH 7.3) NaCl Sucrose DTT CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonate hydrat)	50 mM 100 mM 10 % (w/v) 10 mM 0,1 % (w/v)
Coomassie Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R-250 Methanol Essigsäure H ₂ O	0,5 % (w/v) 45 % (v/v) 5 % (v/v) 55 % (v/v)
Hypotoner Citratpuffer	Natriumcitrat Triton X-100 Propidiumiodid	0,1 % 0,1 % 50 µg/ml
Laufpuffer (SDS-Gelelektrophorese)	Tris (pH 7,4) Glycin SDS	25 mM 0,192 M 0,1 % (w/v)
LB-Agar	Agar	15 g/l LB Medium pH 7
LB-Medium (pH 7,0)	Trypton Hefeextrakt NaCl (<i>Natriumchlorid</i>)	10 g/l 5 g/l 10 g/l
MTT-Lysepuffer	DMSO SDS Essigsäure	99,4 % (v/v) 10 % (w/v) 0,6 %

Nicht-reduzierender SDS Puffer	Tris (pH 7,4) SDS Glycerol Bromphenol blau	62,5 mM 2 % (w/v) 10 % (v/v) 0,25 mg/ml
PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>)	Tris (pH 7,4) Na ₂ HPO ₄ KCL KH ₂ PO ₄	138 mM 8,1 mM 2,7 mM 1,5 mM
RIPA-Lysepuffer (<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>)	Tris (pH 7,5) NaCl SDS NP-40 (<i>Nonoxinol 40</i>) Desoxycholsäure EDTA (<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>)	50 mM 150 mM 0,1 % 1 % 0,5 % 2 mM
Sammelgelpuffer	Acrylamid Tris (ph 6,8) SDS APS (<i>Ammonium Persulfat</i>) TEMED (<i>Tetramethylethylendiamin</i>)	5 % (w/v) 125 mM 0,1 % (w/v) 0,05 % (w/v) 0,1 % (v/v)
SDS Probenpuffer 10x	Tris (pH 7,4) SDS β-Mercaptoethanol Glycerol Bromphenol blau DTT (<i>Dithiothreitol</i>)	62,5 mM 2 % (w/v) 3 % (v/v) 10 % (v/v) 0,25 mg/ml 25 mM
TAE	Tris Essigsäure EDTA	40 mM 20mM 1 mM
TBS (<i>Tris buffered saline</i>)	Tris (pH 7,4) NaCl	20 mM 137 mM
Transfer Puffer (Western Blot)	Tris (ph 7,4) Glycin	25 mM 0,192 M

Trenngelpuffer	Acrylamid	5-12,5 % (w/v)
	Tris (pH 8,8)	375 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,05 % (w/v)
	TEMED	0,05 % (v/v)

McCoy's 5A Zellkulturmedium wurde von Lonza (Köln, Deutschland), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High Glucose von Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) bezogen und je mit 10 % Tetrazyklin-freiem Fetal Bovinem Serum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Life Technologies) versehen.

2.4 Antibiotika für Plasmid-Selektion

Für die Plasmidproduktion in Bakterien wurden je nach vorliegender Resistenz des Plasmids Ampicillin 100 µg/ml oder Kanamycin 40 µg/ml zur Bakterienselektion eingesetzt.

2.5 Bakterienstämme

Die in dieser Studie verwendeten Bakterienstämme und ihre Charakteristiken sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Bakterienstämme und ihre Charakteristiken

Name	Eigenschaften	Referenz
XL1-blue competent <i>E. coli</i>	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proABlacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)]	Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornien, USA) Cat. No.: 200228
One Shot Stbl3TM competent <i>E. coli</i>	F- <i>mcrBmrrhsdS20</i> (rB-, mB-) <i>recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (StrR) <i>xyl-5 λ-leumtl-1; endA1+</i>	Life Technologies Cat. No.: C7373-03

2.6 Eukaryotische Zelllinien

Humane Zelllinien und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Eigenschaften	Kulturmedium	Selektion	Quelle
HCT116	Humanes kolorektales Karzinom	Wildtyp p53	McCoy's 5A	2-4 µg/ml Puromycin	Vogelstein, B. ATCC #CCL-247
HCT116 p53 -/-	Humanes kolorektales Karzinom	p53 Depletion	McCoy's 5A	2-4 µg/ml Puromycin	Vogelstein, B.
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzellen	SV40 T-Antigen	DMEM High Glucose	2 µg/ml Puromycin	DSMZ #ACC-635

2.7 shRNA, esiRNA, siRNA, Plasmide und PCR-Primer

Alle shRNA-Sequenzen (*small hairpin RNA*), esiRNA (*Endoribonuclease-prepared siRNAs*), siRNA (*small interfering RNA*) und PCR-Primer wurden von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) oder Life Technologies, die Plasmide über Addgene (Teddington, Großbritannien) bezogen. Herkunft und Charakteristiken sind in den Tabellen 5-7 aufgeführt.

Tabelle 5: shRNA-Sequenzen

shRNA/siRNA	Sequenz	Referenz
shERp57	GGAATAGTCCCATTAGCAAAG 374-394 bp der humanen ERp57-mRNA (GeneBank NM_005313.4)	Sigma-Aldrich
shPDI	GTGTGGTCACTGCAAACAGTT 1385- 1405 bp der humanen PDI-mRNA (GeneBank ref NM_000918.3)	Sigma-Aldrich
esiP4HB	siPDI Pool	Sigma-Aldrich
siGFP	Katalognummer: 12935-145	Life Technologies

Tabelle 6: PCR-Primer

Primer	Vorwärts-Primer 5' → 3'	Rückwärts-Primer 5' → 3'
hXBP1	AAACAGAGTAGCAGCTCAGACTGC	CCTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG

Tabelle 7: Plasmide

Plasmid	Charakteristik	Referenz
hPDI1-C400S-pFLAG-CMV1	PDI Cystein zu Serin Mutation an Aminosäure 400, funktionell inaktiv, sog. <i>Trap Mutante</i> , CMV Promoter	Addgene (#31384)
hPDI1-WT-pFLAG-CMV1	PDI Wildtyp mit CMV Promoter	Addgene (#31382)
p5xATF6-GL3	Enthält 5xATF6 response element, codiert unter ATF6 Einfluss Firefly-Luziferase	Addgene (#11976)
pEGFP-ATF6	Codiert humanes N-Terminal GFP gekoppeltes ATF6	Addgene (#32955)
pFLAG-XBP1u-FLuc	Codiert unter XBP1 Einfluss Firefly-Luziferase und exprimiert konstitutiv Renilla-Luziferase	Addgene (#31239)
pGL4.74	Exprimiert Renilla-Luziferase aus Renilla reniformes mit HSV-TK Promoter	Promega (E6921)
pMD2.G	Codiert für lentivirale Hüllproteine	Addgene (#12259)
psPAX2	Codiert für lentivirale Verpackungsproteine	Addgene (#12260)
pWPXL	EGFP mit EF-1 α Promotor, lentivirales Kontrollplasmid	Addgene (#12257)
Tet-pLKO-puro	Tetrazyklin induzierbares Konstrukt mit Puromycin-Resistenz für shRNAs	Addgene (#21915)

2.8 Antikörper

Alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in den Tabellen 8-9 beschrieben.

Tabelle 8: Primärantikörper, die in dieser Studie genutzt wurden.

Antigen	Molekulares Gewicht	Produziert in	Produktnummer	Hersteller
P-eIF2 α (Ser51)	38 kDa	Kaninchen	#3398	Cell Signalling
Aktin	42 kDa	Kaninchen	# A2103	Sigma-Aldrich
ATF4	49 kDa	Kaninchen	#11815	Cell Signalling
BiP	78 kDa	Kaninchen	#3183	Cell Signalling
ERp57	60 kDa	Kaninchen	#ab10287	Abcam (Cambridge, Großbritannien)
GAPDH	36 kDa	Kaninchen	#G9545	Sigma-Aldrich
GRP94	90 kDa	Kaninchen	#2104	Cell Signalling
p53 (AB-6)	50 kDa	Maus	#DO-1 #OP43	Calbiochem/Millipore (Billerica, Massachusetts, USA)
PDI	60 kDa	Maus	#MAB4236	R&D Systems (Minneapolis, USA)
PERK	140 kDa	Kaninchen	#5683	Cell Signalling (Frankfurt am Main, Deutschland)
PUMA	23 kDa	Kaninchen	#ABC158	Millipore (Billerica, Massachusetts, USA)

Tabelle 9: Sekundärantikörper, die in dieser Studie genutzt wurden.

Spezifität	Konjugat	Produziert in	Produktionsnummer	Hersteller
α Maus	HRP (<i>Horseradish peroxidase</i>)	Ziege	#P044701-2	DAKO (Glostrup, Dänemark)
α Kaninchen	HRP	Ziege	# P044801-2	DAKO

2.9 Zellkultur

2.9.1 Zellkulturbedingungen für eukaryotische Zelllinien

Humane Zelllinien wurden in einem befeuchteten Inkubator bei 37 °C unter 5 % CO₂ und 21 % O₂ kultiviert. Zur Passagierung der adhärenenten Dauerkulturen wurden die Zellen mit 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung (Life Technologies) 3 min bei 37 °C vom Plastik gelöst. Die Zellen wurden für 3 min bei 280 x g zentrifugiert und in frischem Medium in Verdünnungen zwischen 1:5 und 1:10 wieder ausgesät. Die maximale Konfluenz betrug 70-90 %. Zur Zellzählung wurde das automatische Cellometer Auto T4 von Peqlab benutzt.

2.9.2 Kältekonservierung für eukaryotische Zelllinien

Zur Kältekonservierung wurden die Zellen in FBS mit 10 % DMSO (*Dimethylsulfoxid*) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 1,5 ml Gefriergefäß gefüllt und bei -80 °C gelagert bzw. nach einem Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.9.3 Transfektion von Zellkulturen

Transiente Transfektionen wurden mit Turbofect (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) in einem Verhältnis von 2:1 (µl Transfektionsreagenz zu µg DNA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Virusproduktion wurde GeneJuice (Merck, Darmstadt, Deutschland) in einem Verhältnis von 3:1 (µl Transfektionsreagenz zu µg DNA) nach Herstellerangaben verwendet.

2.9.4 Lentivirus-Produktion

Lentiviren wurden in HEK293T Zellen produziert. 8×10^5 Zellen wurden in 25 cm² Flaschen ausgesät und ab einer Konfluenz von 50 % kotransfiziert (s. 2.9.3). Drei verschiedene Plasmide sind zur Virenproduktion nötig: 6 µg tet-pLKO-puro Vektor, enthält die shRNA (*short hairpin RNA*) zur induzierbaren Zielsuppression, 4 µg psPAX2, das Verpackungsplasmid und 2 µg pMD2.G, welches für das virale Hüllprotein codiert. Die transfizierten Zellen wurden 48-60 h kultiviert, anschließend der Überstand durch einen 0.45 µm Filter steril filtriert und die Viren entweder sofort für die Transduktion genutzt, oder als 2 ml Aliquots bei -80 °C bis zur Benutzung eingefroren.

2.9.5 Lentivirale Transduktion und Generierung von stabilen

Knockdown- (KD) und Doppel-Knockdown-Zelllinien (DK)

2×10^5 Zellen wurden in 25 cm^2 Zellkulturflaschen ausgesät und mit 2×10^6 Viruspartikeln (1:10 Verhältnis) mit 8 µg/ml Polybrene zur Steigerung der Adhärenz der Viren an die Zellen resuspendiert. Nach 24 h Inkubation wurde die Viruslösung abgenommen und durch normales Zellkulturmedium ersetzt. Wurden Wildtyp-Zellen transduziert, wurde anschließend mit $2\text{--}4 \text{ µg/ml}$ Puromycin selektiert. Die ideale Selektionskonzentration für HCT116-Zellen wurde zuvor mit Dosis/Reaktions-Messungen bestimmt. Nach der Selektion wurden die Zellen in normalem Zellkulturmedium weiter kultiviert und der Knockdown (KD) mittels Western Blot überprüft. Zur Generierung von Zelllinien mit Doppelknockdown (DK) wurden 2×10^5 bereits transduzierte ERp57-KD-Zellen erneut mit Lentivirus mit shRNA gegen PDI oder bereits transduzierte PDI-KD-Zellen erneut mit Lentivirus mit shRNA gegen ERp57 transduziert. Da die tet-pLKO-puro Plasmide nur eine Puromycin-Resistenz-Kassette exprimieren, entfällt der Selektionsschritt nach der zweiten lentiviralen Transduktion.

2.9.6 KD-Induktion

Um den Zielgen-KD zu induzieren, wurden die transduzierten Zellen in Zellkulturmedium mit 250 ng/µl Doxycyclin für die angegebenen Zeiten kultiviert.

2.9.7 Bestrahlung

Für die Bestrahlungsversuche wurden 1×10^5 bis 2×10^5 Zellen in P60er Zellkulturschälchen ausgesät, der KD induziert und 48 h bis zu einer Konfluenz von 50 % wachsen gelassen. Vor der Bestrahlung wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Die Bestrahlung erfolgte mit einem Isovolt 320 (Pantak-Seifert, East Haven, Connecticut, USA), 320 kV Spannung, 10 mA Stromstärke mit einem 1.65 mm Aluminium Filter. Die effektive Photonen-Energie betrug 90 kV mit einer Dosisrate von $2,76 \text{ Gy/min}$. Für die weiterführende Analyse wurden die Zellen entsprechend der gewünschten Methodik weiter behandelt.

2.9.8 Behandlung mit chemischen Inhibitoren

1×10^5 bis 2×10^5 Zellen wurden ausgesät und der KD induziert. Nach 48 h wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und durch Medium mit der angegebenen Konzentration des

Inhibitors ersetzt (bei 48 h Inkubation mit Inhibitor) oder es wurde 1 ml Zellkulturmedium mit 4-facher Konzentration des Inhibitors zu den bereits vorhandenen 3 ml im Zellkulturschälchen dazugegeben (bei 24 h Inkubation mit Inhibitor).

2.9.9 MTT-Zellviabilitätsassay

1×10^3 bis 2×10^3 Zellen in 100 μ l Zellkulturmedium pro Vertiefung wurden in einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Nach 4 h wurde der KD mittels 100 μ l 500 ng/ μ l (final 250 ng/ μ l) Doxycyclin induziert. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die Zellen mit 0,5 mg/ml Thiazolyl blau Tetrazolium Bromid (MTT) bei 37 °C 1-3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit MTT-Lysepuffer lysiert und die Absorption bei 540 nm mit 700 nm als Referenzwellenlänge in einem Epoch Mehrmodus Lesegerät gemessen. Die Kontrollen wurden als 100 % Viabilität definiert und die Abnahme der Viabilität durch KD-Induktion in %-Abnahme von der Kontrolle angegeben.

2.9.10 Koloniebildungstest

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mittels Trypsin abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden drei Verdünnungen mit 1×10^5 , 1×10^4 und 1×10^3 Zellen pro Milliliter angesetzt. Entsprechend der folgenden Behandlung (KD, Bestrahlung) wurde die Zellzahl gemäß der Toxizität angepasst (100 – 6400 Zellen pro Well), in kollagenbeschichtete 6-Well Platten ausgesät und der KD induziert. Nach 20 h im Inkubator wurden die Platten mit 1 oder 3 Gray (Gy) bestrahlt und dann 10 Tage im Inkubator belassen. Zum Abschluss des Versuches wurde das Medium entfernt, die gewachsenen Kolonien 20 min mit 0,4 % PFA (Paraformaldehyd) und 10 min mit 70 % Ethanol fixiert. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue für eine Stunde, die Fotos wurden mit dem Fusion-FX7 angefertigt. Zur statistischen Auswertung wurde die Plattierungseffizienz (PE) der Kontrollzellen mittels der Formel „PE=Anzahl gebildeter Kolonien/Anzahl ausgesäter Zellen“ bestimmt und gleich eins gesetzt. Daraus berechnet sich die Überlebensfraktion (SF) der behandelten Zellen mit der Formel „SF=Anzahl gebildeter Kolonien nach Behandlung/Anzahl ausgesäter Zellen*PE“. Dargestellt sind die Ergebnisse als prozentuale Abnahme der SF im Vergleich zur Kontrolle mit Standardabweichung der Triplikate.

2.10 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei 562 nm mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA) bestimmt. Das Kit stammt von Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) und wurde nach den Anweisungen des Herstellers benutzt. Bovines Serum Albumin (BSA) diente als Standard.

2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden Totalzelllysate in RIPA Puffer mit Protease-Inhibitor Cocktail (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) präpariert. 30 µg Proteinlysate wurden auf 30 µl 10 x SDS Probenpuffer angesetzt, für 10 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend in einem 10 % Polyacrylamid Gel der Größe nach aufgetrennt. Für nicht-reduzierende Gele wurden die Zellen in Caspase-Lysepuffer lysiert und die Proteine in nicht-reduzierendem SDS Probenpuffer (kein β -Mercaptoethanol, kein DTT) aufgenommen.

2.12 Western Blot

Nach der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mittels Western Blot auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran übertragen. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindung wurde die Membran anschließend mit 5 % Milchpulver in TBST (TBS, 0,1 % Tween) blockiert. Die Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Für die Detektion der HRP-gekoppelten Sekundärantikörper wurde ein ECL (*enhanced chemiluminescence*) Kit (Thermo Fisher Scientific) und das FX7 Chemilumineszenz Detektionssystem verwendet. Die Experimente wurden mindestens 3 Mal wiederholt, repräsentative Western Blots sind gezeigt.

2.13 Maleimid-Assay

Zur besseren Differenzierung zwischen oxidiertem und reduziertem Proteinstatus wurden Maleimid-Assays durchgeführt. Die Zellen wurden für 96 h in 6-Well Platten unter den angegebenen Bedingungen kultiviert. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die Positivkontrollen 10 min bei 37 °C mit 5 mM Diamid und die Negativkontrollen mit 10 mM

DTT inkubiert, um die Proteine vollständig zu oxidieren bzw. zu reduzieren. Anschließend wurden die Zellen auf 4 °C heruntergekühlt und 20 min in eiskaltem PBS mit 20 mM NEM (N-Ethylmaleimid) inkubiert, um die reduzierten Cysteinreste zu alkylieren und damit den Oxidationsstatus zu konservieren. Nach abschaben der Zellen und waschen in PBS erfolgte die Lyse in 80 µl RIPA Puffer über 30 min. Je 80 µl des Lysats wurden mit 2 µl 0,5 M TCEP (Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (Verdünnung 1:40; final 12 mM)) 20 min inkubiert, um alle oxidierten Cysteinreste zu reduzieren und sie für den nächsten Alkylierungsschritt zugänglich zu machen. Durch Zugabe von 16 µl 85 mM 5 kDa-MPEG (Methoxypolyethylen Glykol Maleimid) in DMSO (Verdünnung 1:5,125; final 16,6 mM) und 60 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die reduzierten Thiole alkyliert. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung wurden die Lysate, wie in 2.11 beschrieben, für die Gelelektrophorese aufbereitet. Im anschließenden Western Blot stellt sich die erfolgte MPEG-Alkylierungsreaktion als eine Größenzunahme von je 5 kDa pro Cysteinrest dar.

2.14 Auswertung transienter Transfektionen mit fluoreszierenden Fusionsproteinen

1×10^5 Zellen wurden auf Ratten Kollagen I beschichteten Glassplättchen in einer 24-Well Zellkulturplatte ausgesät und mit 1 µg Plasmid DNA nach Protokoll (s. 2.9.3) transfiziert. Nach 4 h wurde das Transfektionsmedium entfernt, durch frisches Zellkulturmedium ersetzt und der KD induziert. Nach 72 h wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, in 0,4 % Paraformaldehyd fixiert und mit 3,3 µg/ml Hoechst in PBS gegengefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Glasplättchen mit DAKO *fluorescent mounting medium* auf einen Objektträger überführt und mit einem konfokalen Zeiss LSM510 Mikroskop mit einer 63x/1.2 NA Öl Immersions Linse (Carl Zeiss) analysiert. Repräsentative Bilder aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen sind gezeigt.

2.15 RNA-Isolation, Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

Zur Isolation der RNA wurde das Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die RNA-Konzentration wurde anschließend

mittels Epoch Multifunktions Lesegerät bei 260 nm photometrisch bestimmt und die Reinheit der Isolation durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm überprüft. Für die reverse Transkription wurde 1 µg RNA eingesetzt und mit dem *High-Capacity Reverse Transcriptions* Kit (Life Technologies) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Die cDNA-Konzentration wurde bei 260 nm photometrisch quantifiziert. Der Standard PCR-Ansatz bestand aus 2 ng/µl cDNA, 2,5 µl 10 x Taq Puffer (NEB Bioscience, Frankfurt am Main, Deutschland), 200 µM Desoxynukleotidtriphosphate (Thermo Fisher Scientific), je 1 µM Vorwärts- und Rückwärts-Primer (Sigma-Aldrich) und 0,05 U/µl Taq Polymerase (NEB Bioscience) in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Die PCR-Reaktionen wurden in einem TRIO thermal cycler (Biometra, Göttingen, Germany) mit folgenden Zykluseinstellungen durchgeführt: 1x (5 min 95 °C); 25-30 x (95 °C 1 min; 60 °C 1min; 72 °C 1min); 1x (60min 2 °C).

2.16 Transformation von kompetenten Bakterien

Hitzeschock-Transformationen von kompetenten Bakterien, die in Tabelle 3 gelistet sind, wurden zur Einbringung von DNA-Plasmiden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.17 Plasmid-DNA-Isolation

XL1-blue *E. coli* wurden für die Präparation von stabiler Plasmid-DNA, One Shot Stbl3™ *E. coli* für instabile DNA (z.B. lentivirale DNA) benutzt. Die Isolation der Plasmide erfolgte mengenabhängig entweder mit dem Minipräp Kit von Thermo Fisher Scientific oder Maxipräp Kit von Qiagen nach den Anweisungen des Herstellers.

2.18 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese zur DNA-Analyse wurde in 1 x TAE Puffer mit dem MINI GEL II System (VWR, Darmstadt, Germany) durchgeführt. Die Prozentigkeit des Agarose-Gels lag je nach Größe der erwarteten DNA-Produkte zwischen 1 und 2,5 %, *Sybr Green* (Life Technologies) wurde zur Anfärbung der DNA nach den Angaben des Herstellers verwendet. Zur Darstellung der DNA im Agarose-Gel wurde das Fusion-FX7 Dokumentationssystem verwendet. Als Größenmarker dienten die 100 bp oder 1 kbp Leiter von Thermo Fisher Scientific.

2.19 Caspase-3 Enzym-Aktivitäts-Assay

Zur Überprüfung des apoptotischen Zelltods wurde die Aktivität der Effektorcaspase-3 über die Spaltung der Caspase-3 spezifischen Substratsequenz DEVD von Asp-Glu-Val-Asp 7-amido-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-Amc, Sigma-Aldrich, A1086) gemessen. Dabei entsteht das fluoreszierende 7-amino-4-methylcoumarin (Amc), welches als Indikator für die apoptotische Aktivität quantifiziert wurde. Die Zellen wurden wie beschrieben behandelt und in Caspase-Lyse Puffer (pH 7,3) lysiert. 50 µg Proteinlysate wurden mit 50 µM DEVD-AMC in Caspase-Substratpuffer (pH 7,3) in einer schwarzen 96-Well Zellkulturplatte bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde 4 h alle 10 min bei einer Anregung von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm in einem FLX800 Fluoreszenzlesegerät gemessen. Für die Analyse wurde ein einzelner Wert im linearen Abschnitt der Messung verwendet und als Balkendiagramm dargestellt. Die Kontrollen wurden gleich eins gesetzt, der Anstieg der behandelten Proben als prozentualer Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Repräsentative Ergebnisse von drei unabhängigen, jeweils mit n=3 durchgeführten Versuchen sind gezeigt.

2.20 Zellzyklus-Analyse

1×10^5 Zellen wurden in P60er Zellkulturschälchen ausgesät und wie angegeben behandelt. Nach Abschluss der Versuchszeit wurden die Zellen mit 0,25 % Trypsin vom Plastik gelöst, in ein 15 ml Röhrchen überführt, bei 350 x g abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml frischem PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und 4×10^5 Zellen in 400 µl hypotonem Citratpuffer aufgenommen und 45 min inkubiert, um die intakten Zellkerne zu isolieren und die DNA mit Propidiumiodid anzufärben. Der DNA-Gehalt der Zellkerne wurde mittels Durchflusszytometer im 640 nm rot Bereich gemessen, je 6×10^4 Events wurden ermittelt. Die Datenanalyse erfolgte mit FCS Express 4 (De Novo Software, Glendale, Kalifornien, USA), Zelltrümmer und Dubletten wurden bei der mathematischen Analyse eliminiert.

2.21 Luziferase-Assay

6×10^4 Zellen wurden in einer 24-Well Zellkulturplatte ausgesät und anschließend mit 1 µg Firefly-Luziferase-Plasmid mit dem *responsive element* und 0,25 µg Renilla-Luziferase-Plasmid zur Transfektionseffizienzkontrolle kotransfiziert. Nach 4 h

Inkubation wurde das Transfektionsmedium abgenommen und der KD induziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit PBS gewaschen, bei 1000 x g zentrifugiert und in 500 µl passivem Lysepuffer (DUAL Luziferase Kit, Promega, Madison, Wisconsin, USA) nach den Herstellerangaben lysiert. Nach der Lyse wurden die Zellreste bei 1000 x g abzentrifugiert und die Proteinlysate bis zur Messung bei -80 °C aufbewahrt. Die Messung der Firefly- und Renilla-Luziferase wurden in Rundboden Glasröhrchen mit einem Turner Design TD-20/20 Luminometer durchgeführt, die Substrate für Firefly- und Renilla-Luziferase wurden nach den Herstellerangaben eingesetzt (DUAL Luziferase Kit, Promega). Die Aktivität der Firefly-Luziferase wurde auf die Aktivität der Renilla-Luziferase als Transfektionseffizienzkontrolle normalisiert. Die Kontrollproben wurden als eins definiert und Änderungen der Aktivität als prozentualer Anstieg von der Kontrolle dargestellt. Repräsentative Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen sind gezeigt.

2.22 Statistische Auswertung

Repräsentative Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen sind gezeigt. Statistische Signifikanzen zwischen zwei Gruppen wurden mittels studentischem t-Test oder, bei mehr als zwei Gruppen, mittels Two-Way Anova und post-hoc Test ermittelt. Die p-Werte sind verschiedenen Irrtumswahrscheinlichkeiten zugeordnet, wobei n.s. = nicht signifikant, * bedeutet < 5 %, ** bedeutet < 1 % und *** bedeutet < 0,1 %.

3. Ergebnisse

3.1 Funktionsweise des induzierbaren lentiviralen tet-pLKO-puro Systems und Generierung der Knockdown-Zelllinien

Zur Generierung der ERp57 und PDI Doppel-Knockdown-Zellen (DK-Zellen) wurde mittels lentiviraler Transduktion induzierbare shRNA gegen ERp57 und PDI nacheinander in die humane kolorektale Karzinom Zelllinie HCT116 eingebracht. Durch Integration der shRNA, ihres Promoters, des TetR-Repressors und der Puromycin Resistenzkassette in das Genom der Wirtszelle, wurde eine dauerhafte, induzierbare Hemmung der Translation der Zielproteine durch Doxycyclin Zugabe möglich.

Doxycyclin bindet und inaktiviert den konstitutiv gebildeten TetR-Repressor, der den Promoter vor der shRNA-Kassette in Abwesenheit von Doxycyclin blockiert. Daher wird die Transkription der spezifischen shRNA durch Doxycyclin aktiviert. Die shRNA führt im Rahmen eines *RNA silencings* zur sequenzabhängigen Degradation der Zielgen-mRNA, was zu einem KD auf Proteinebene führt (Abb. 5A).

Um eine möglichst hohe KD-Effizienz zu garantieren, wurden drei shRNA-Konstrukte gegen PDI in bereits mit shERp57 infizierten HCT116 getestet (#93, #94, #97, Abb. 5B). Eine effiziente shRNA gegen ERp57 war bereits durch vorangegangene Projekte bekannt (Husmann et al., 2015). #94 wurde auf Grund des stärksten KDs auf Proteinebene gegen PDI (ca. 80-85 %) für die weiteren Versuche in den HCT116 DK ausgewählt und verwendet.

Darüber hinaus erkennt man in der Abbildung 5 die Spezifität der verwendeten Antikörper gegen PDI und ERp57, trotz hoher Homologie der beiden ER-Oxidoreduktasen.

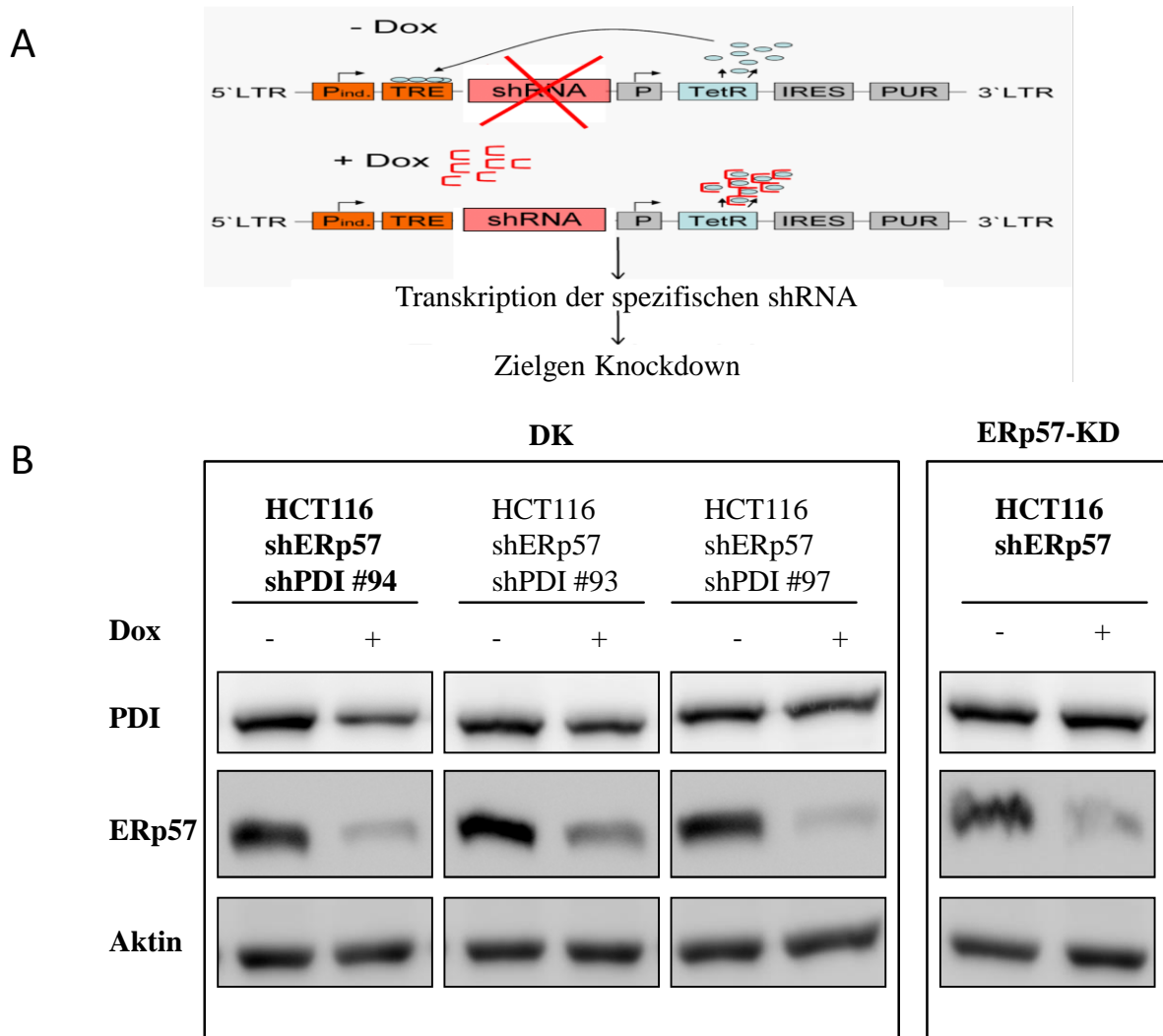


Abbildung 5: Funktionsweise des induzierbaren tet-pLKO-puro Plasmids.

A) Ohne Tetrazyklin blockiert der TetR Repressor die Transkription der spezifischen shRNA. Unter Doxycyclin Einfluss wird der Repressor gebunden und inaktiviert, die Transkription der shRNA wird möglich. B) Repräsentative Western Blots der ERp57-KD und DK-Zellen. Gezeigt sind die Proteine ERp57, PDI und Aktin nach 48h KD-Induktion. Es standen drei unterschiedliche shRNA-Konstrukte gegen PDI zur Verfügung, #94 wurde aufgrund der höchsten Effizienz ausgewählt und für diese Studie verwendet (fett markiert). Darüber hinaus erkennt man die Spezifität der verwendeten Antikörper gegen PDI und ERp57.

3.2 Depletion von ERp57 und PDI und ihr Einfluss auf die Apoptose unter ionisierender Bestrahlung

In einem vorangegangenen Projekt konnte gezeigt werden, dass HCT116-Zellen mit gesteigerter Apoptose auf ionisierende Bestrahlung und verschiedene Chemotherapeutika reagieren, wenn ERp57 depletiert ist. Dieser Effekt ließ sich auf eine Aktivierung von PERK und des Tumorsuppressors p53 (Phosphorylierung an Ser15, Induktion von PUMA) zurückführen (Hussmann et al., 2015).

Die Caspase-3-Aktivität stieg wie in den HCT116 shERp57 auch in den HCT116 DK-Zellen unter KD-Induktion mit und ohne Bestrahlung an (Abb. 6A). Allerdings betrug der Anstieg in den HCT116-DK-Zellen durch KD nur noch maximal 40 %, im Vergleich zu 250 % in den HCT116 shERp57. Nach 10 Gy Bestrahlung steigerte der ERp57-KD die Caspase-3 Aktivität von 3-fach auf 4-fach, in den DK-Zellen war nur ein leichter, nicht signifikanter Anstieg von 2,8- auf 3,0-fach zu erkennen.

Diese geringere Induktion der Apoptose spiegelte sich ebenfalls in der Proteinexpression beider Zelllinien wieder: Unter KD-Induktion erkennt man einen stärkeren Anstieg von p53 in den HCT116 shERp57-Zellen als in den DK-Zellen (Abb. 6B).

Zur Bestätigung des Caspase-3-Assays wurde zusätzlich die Spaltung von PARP (*Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1*) (Caspase-3 abhängig) im Western Blot untersucht. Auch hier zeigte sich in den HCT116 shERp57 der deutlichste Effekt (Abb. 7).

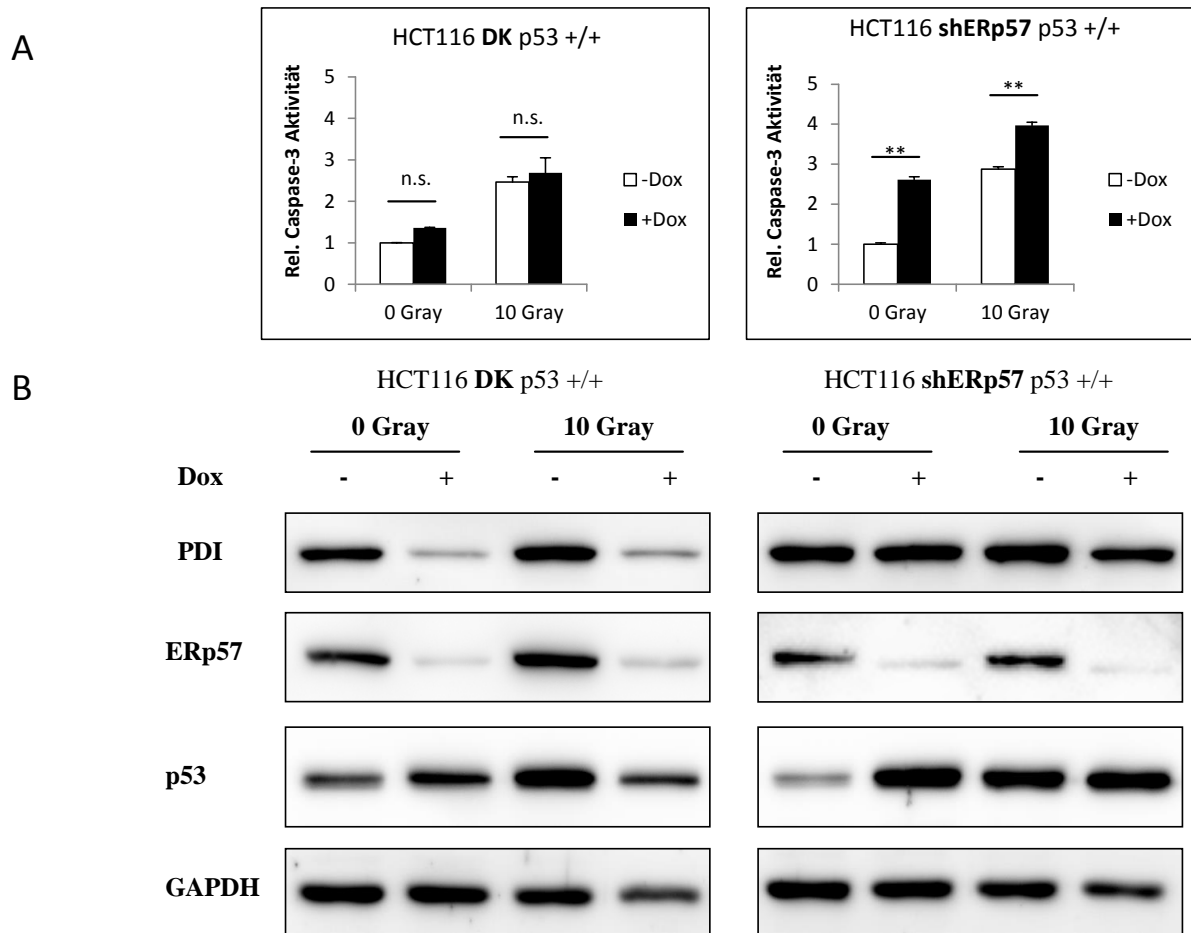


Abbildung 6: Depletion von ER-Oxidoreduktasen induziert Apoptose und sensitiviert HCT116 p53 +/+ Zellen gegenüber ionisierender Strahlung.

A) Ergebnisse eines Caspase-3-Assays in HCT116 DK und shERp57-KD nach 96 h Induktion und 72h nach 10 Gy Bestrahlung. Beide Zelllinien reagierten mit erhöhter Caspase-3-Aktivität nach dem Verlust von ER-Oxidoreduktasen und der Bestrahlung mit 10 Gray. Die stärkste Aktivierung der Caspase-3 zeigte sich in den HCT116 shERp57 Zellen. B) Die repräsentativen Western Blots zeigen KD-Effizienz und die Induktion des Tumorsuppressors p53, welche passend zur Caspase-3-Aktivität in den HCT116 shERp57 Zellen am stärksten ausfiel.

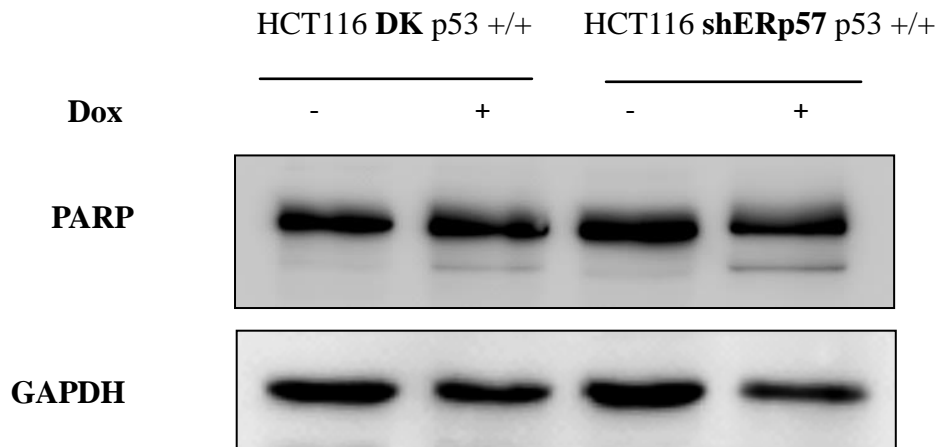


Abbildung 7: PARP-Spaltung bestätigt die Ergebnisse aus den Caspase-3-Assays.

Gezeigt ist PARP-Spaltung im Western Blot. Entsprechend der höheren Caspase-Aktivität zeigten die HCT116 shERp57 p53 +/+ Zellen die stärkste PARP-Spaltung.

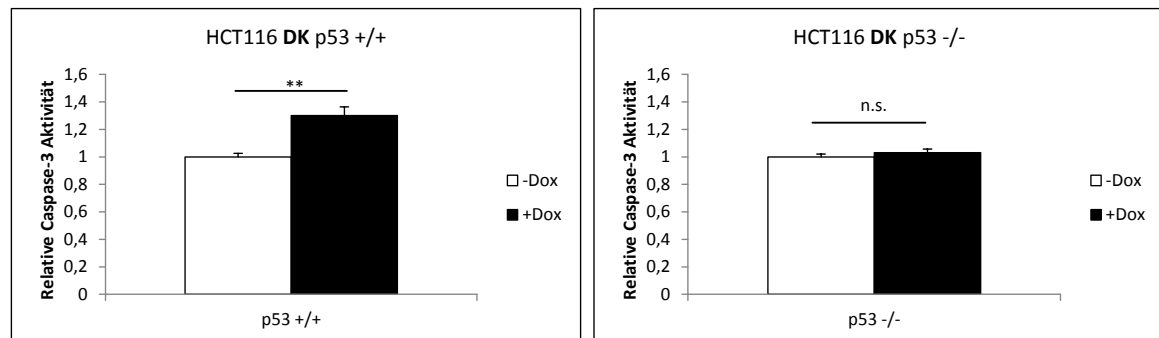
3.3 Die Rolle von p53 in der Initiation der Apoptose nach Depletion von ERp57 und PDI

Um zu evaluieren, welche Rolle die Stabilisierung von p53 (Abb. 6B) in der Initiation der Apoptose spielt, wurden genetisch identische HCT116 p53-negative Zellen (HCT116 p53 -/-) mit shRNA gegen PDI und ERp57 transduziert, im Caspase-3-Assay untersucht und mit den HCT116 DK p53 WT Zellen (HCT116 DK p53 +/+) verglichen.

Trotz identischer KD Effizienz ist ohne p53 kein Nachweis von Apoptose im Caspase-3-Assay mehr möglich (Abb. 8A). Dies beweist einen p53-abhängig induzierten, apoptotischen Stoffwechselweg in den DK-Zellen, welcher auch in den HCT116 shERp57 nachgewiesen werden konnte. Die p53-abhängige Apoptose war in den HCT116 DK-Zellen jedoch weit weniger stark aktiviert. (s. 3.2 und Abb. 6A)

Darüber hinaus konnte wie in Abbildung 8B zu sehen, ein Anstieg des p53 Zielgens PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) in HCT116 DK p53 +/+, jedoch nicht in p53 -/- Zellen nachgewiesen werden, was die transkriptionelle proapoptotische Aktivität von p53 in diesen Versuchen belegte.

A



B

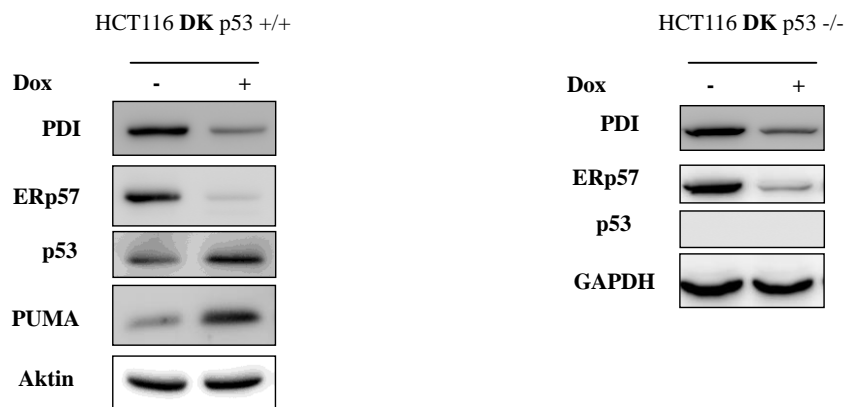


Abbildung 8: Die Aktivierung der Caspase-3 ist auch in DK-Zellen vom p53 Status abhängig.

A) Gezeigt sind zwei Caspase-3-Assays in HCT116 DK-Zellen mit und ohne p53. In p53 -/- Zellen führte der DK zu keiner Caspase-3-Aktivierung. B) Die repräsentativen Western Blots zeigen KD-Effizienz, p53 Stabilisierung und Induktion des proapoptotischen p53 Zielgens PUMA (In p53 -/- nicht detektierbar).

3.4 Zellviabilität und Zellzyklus

Unsere Arbeitsgruppe konnte in einer vorhergehenden Studie zeigen, dass nicht nur die Apoptose unter ERp57-KD ansteigt, sondern die Zellen unabhängig vom p53 Status einem Proliferationsstopp und G2-Arrest unterliegen (Hussmann et al., 2015).

In Abbildung 9 sind MTT-Assays und Zellzyklusanalysen von HCT116 DK p53 +/+, DK p53 -/- und shERp57 p53 +/+ dargestellt.

Die Zellviabilität sank sowohl in den HCT116 DK p53 +/+, als auch in den DK p53 -/- Zellen nach 96 h KD-Induktion auf etwa 60 % ab. Den stärksten Verlust der Viabilität mit einem Rückgang auf 45 % verzeichneten jedoch die HCT116 shERp57 p53 +/+ Zellen (Abb. 9A).

Der Zellzyklus (Abb. 9B) blieb durch DK-Induktion unverändert. Dies war unabhängig vom p53-Status. Die HCT116 shERp57 Zellen reagierten hingegen mit stark gesteigertem G2-Arrest von 10 % auf 25 % durch Depletion von ERp57.

Trotz geringerer Apoptose und fehlendem G2-Arrest stellte sich ein Viabilitätsverlust von 40 % in den HCT116 DK-Zellen unabhängig vom p53-Status ein. Der maximale Viabilitätsverlust von 55 % in 96 h ergab sich jedoch in den HCT116 shERp57.

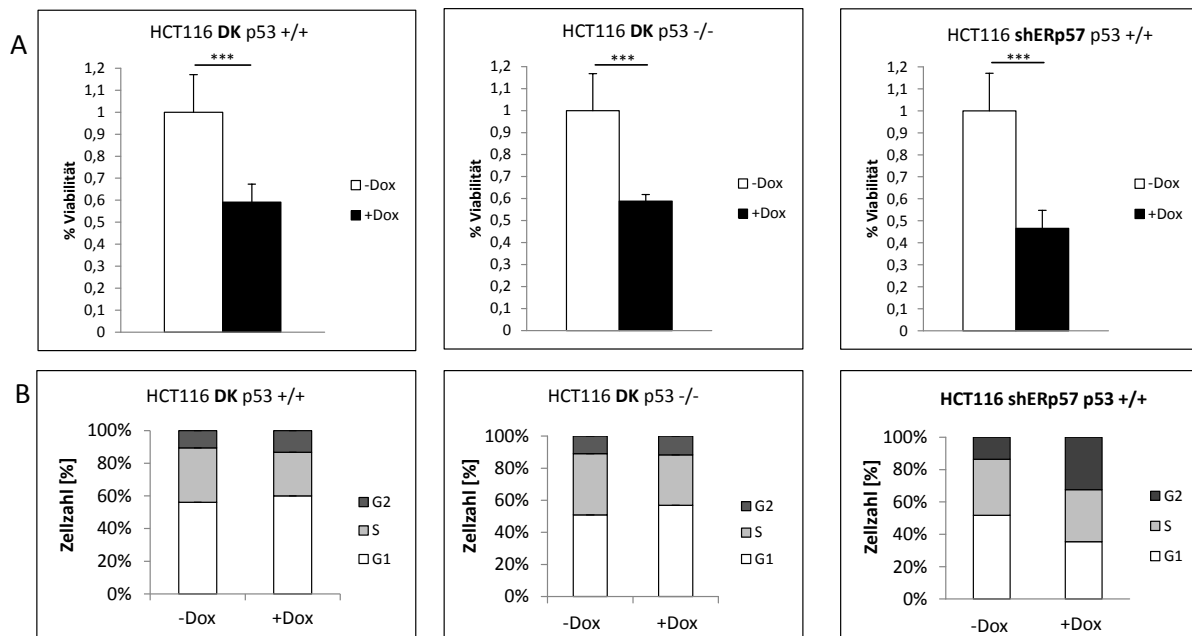


Abbildung 9: Die Zellviabilität nimmt trotz geringer Apoptose und unabhängig vom p53 Status in HCT116 DK ab.

A) Dargestellt sind drei MTT-Assays nach 96 h Inkubation mit Doxycyclin. Die Viabilität sank in den HCT116 DK-Zellen unabhängig vom p53 Status auf 60 % ab. Am stärksten fiel die Abnahme jedoch in den HCT116 shERp57 p53 +/+ aus, die auf die gesteigerte Apoptoserate und den G2-Arrest zurückzuführen war. B) Zellzyklus Analyse in HCT116-Zellen. Es war im Gegensatz zu den HCT116 shERp57 p53 +/+ kein vermehrter G2-Arrest unter DK feststellbar.

3.5 Klonogenes Überleben

Zur besseren Beurteilung des Einflusses auf die Bestrahlungssensitivität unter KD-Induktion wurden Koloniebildungstests durchgeführt. In Abb. 10 sind vergleichend die Ergebnisse von HCT116 DK p53 +/+ und shERp57 p53 +/+ dargestellt.

Schon auf den Fotos zeigte sich eine starke Einschränkung des klonogenen Überlebens mit und ohne Bestrahlung in beiden Zelllinien durch KD-Induktion. Die statistische Auswertung zeigte eine Reduktion der Überlebensfraktion in HCT116 DK p53 +/+ unter KD-Induktion von 100 % auf 11,8 %, bei 1 Gray von 31,4 % auf 5,1 % und bei 3 Gray von 7,3 % auf 1,04 %. In HCT116 ERp57 p53 +/+ unter KD-Induktion von 100 % auf 38,0 %, bei 1 Gray von 38,0 % auf 11,9 % und bei 3 Gray von 7,8 % auf 2,8 %.

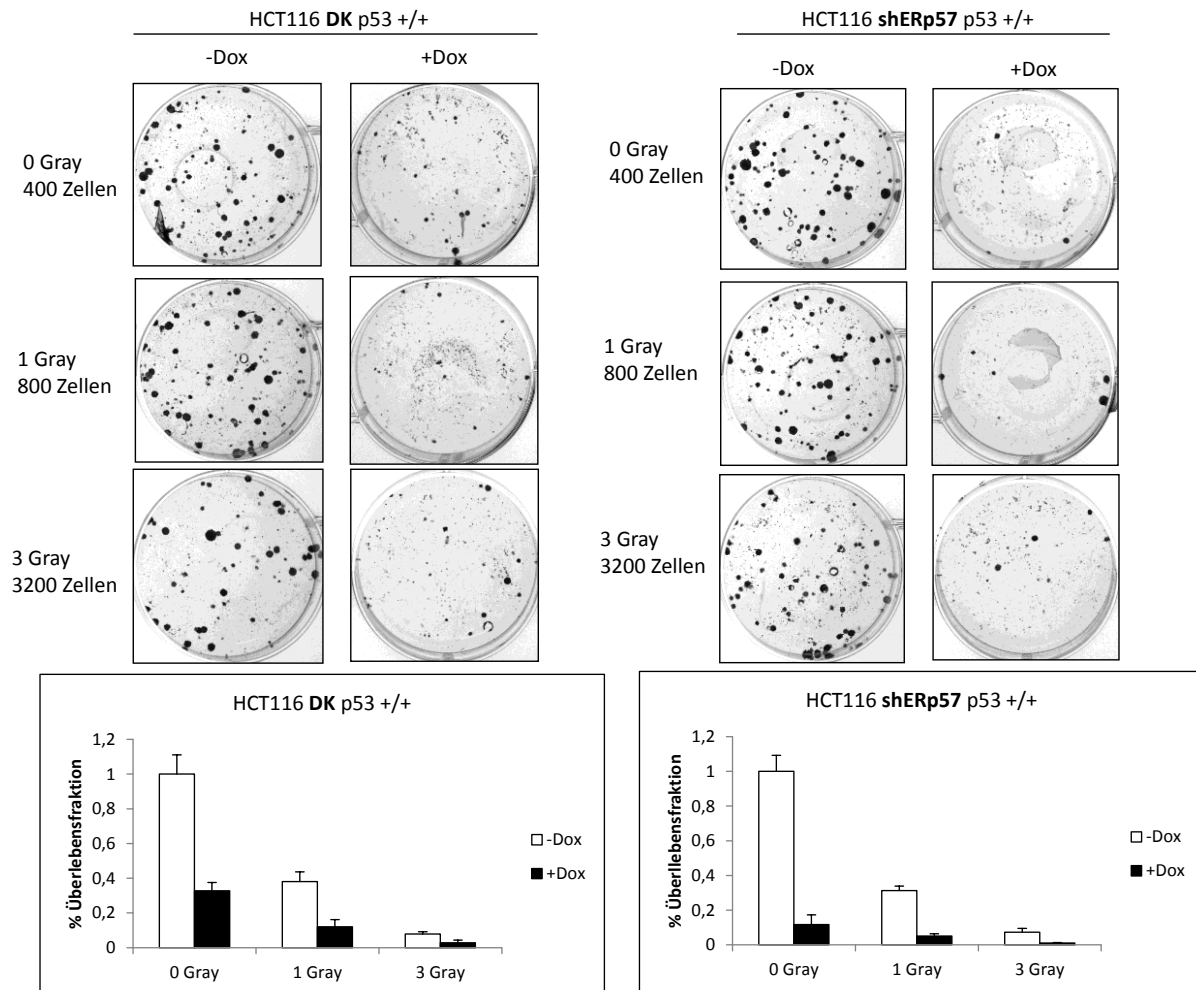


Abbildung 10: Depletion von ERp57 und PDI verringert das klonogene Überleben von HCT116-Zellen.

Gezeigt sind Bilder der gewachsenen Kolonien in HCT116 DK und shERp57 sowie die statistische Auswertung. Das klonogene Überleben war in beiden Zelllinien durch KD-Induktion massiv eingeschränkt und erhöhte die Sensitivität auf Bestrahlung mit 1 und 3 Gray. Wie im MTT-Assay zeigte sich in den HCT116 shERp57 die stärkste Reduktion des klonogenen Überlebens. Die ausgesäte Zellzahl wurde an die Toxizität der Behandlung angepasst.

3.6 ATF6-Aktivität in HCT116 DK-Zellen

Wie in 3.2 bis 3.5 beschrieben, zeigten die HCT116 DK-Zellen eine geringere Apoptoserate als die HCT116 shERp57 Zellen, bei annähernd gleich starkem Viabilitätsverlust und stark reduziertem klonogenem Überleben. Zur Evaluation dieses Apoptoserückgangs wurden die bekannten ER-Stress Kompensationsmechanismen mittels verschiedener Methoden überprüft.

Die Aktivität des hauptsächlich als antiapoptotisch beschriebenen ATF6 wurde mittels transienter Transfektion eines ATF6-GFP-Fusionsproteins überprüft. Die DK-Induktion führte nicht zu einer wesentlichen Translokation von ATF6 in den Nukleus (Abb. 11A). Hingegen führte die Positivkontrolle Thapsigargin zu einer praktisch kompletten Translokation in den Zellkern.

Da eine geringfügige Fluoreszenz im Zellkern nachweisbar war, wurde zur Stärkung der Aussage ein Luziferase-Assay durchgeführt, welches zur ATF6-abhängigen Expression von Luziferase führt und damit die transkriptionelle Aktivität von ATF6 im Nukleus abbildet.

Es zeigte sich über den gesamten Versuchszeitraum von 72 h ein leichter Anstieg der Aktivität von 1,5-1,8-fach durch DK-Induktion im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle. Die Positivkontrolle mit 10 μ M für 24 h Thapsigargin erreicht jedoch einen 17-fachen Anstieg, sodass wir nur von einer marginalen Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF6 unter DK ausgehen konnten (Abb. 11B).

Als Kontrolle der oben beschriebenen Methoden wurde das ATF6 Zielgen BiP im Western Blot untersucht. Passend zu den anderen Ergebnissen ließ sich unter DK-Induktion kein, mit 10 Gray Bestrahlung in Kombination mit dem DK allenfalls ein leichter Anstieg von BiP nachweisen (Abb. 11C).

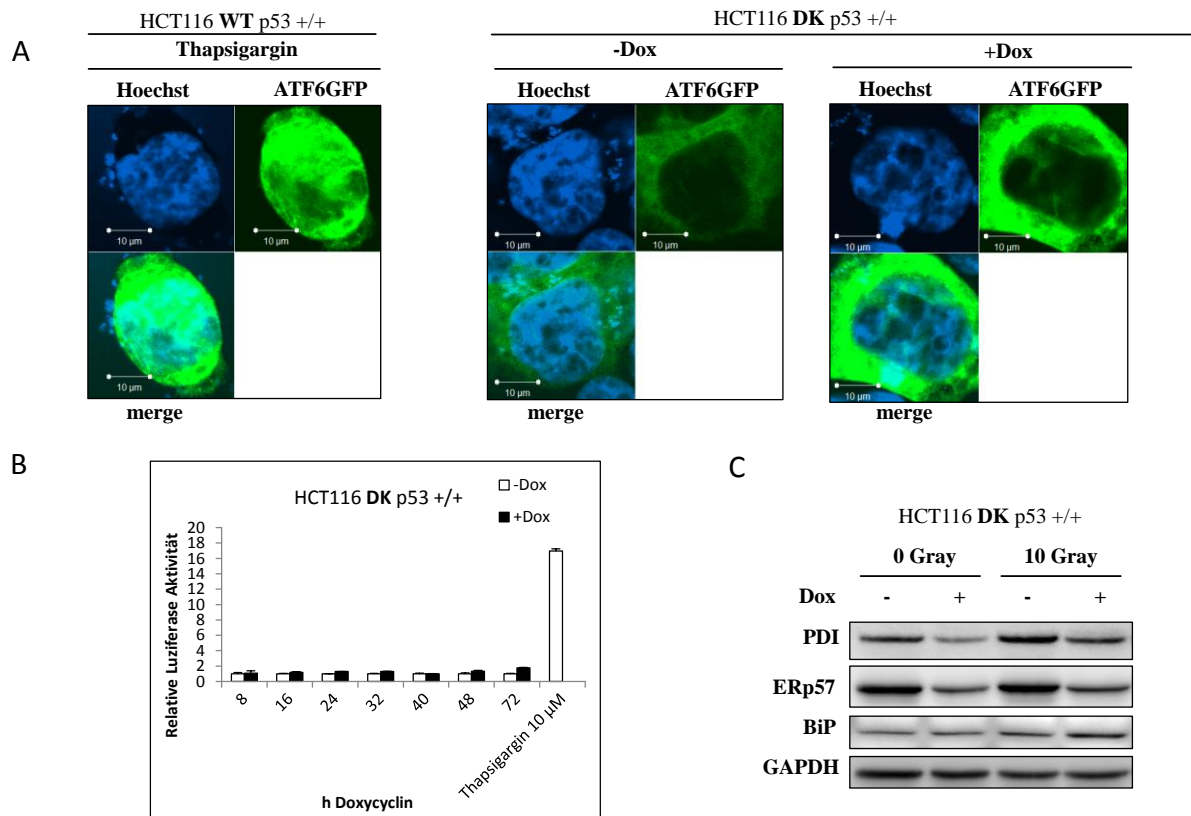


Abbildung 11: ATF6 ist marginal aktiv und nicht für die Reduktion der Apoptose verantwortlich.

A) In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich unter DK eine geringfügige Translokation des ATF6GFP Konstruktes in den Nukleus. B) Zur funktionellen Untersuchung wurde ein Luziferase-Assay mit 5xRE ATF6 Plasmid durchgeführt. ATF6 war unter DK-Induktion nur marginal aktiviert, der ER-Stressor Thapsigargin (10 μ M, 24h) diente als Positivkontrolle. C) Zur Überprüfung der physiologischen Relevanz wurde das ATF6 Zielgen BiP im Western Blot überprüft, welches nicht induziert war.

3.7 IRE1 in HCT116 DK-Zellen

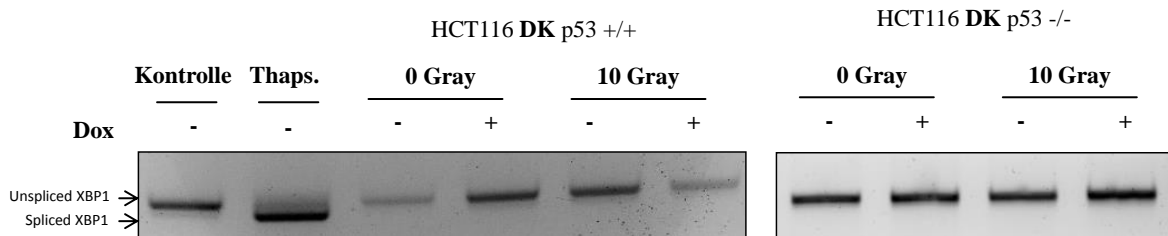
Die Aktivität des zweiten ER-Stress Sensors IRE1 lässt sich durch qualitative Messung der XBP1 mRNA-Spleißvariante bestimmen. Ist IRE1 aktiviert, wird das Intron der XBP1-mRNA durch die RNase Aktivität herausgeschnitten. Im Agarosegel lässt sich ein Größenunterschied von 29 bp nachweisen.

In Abbildung 12 ist ein Agarosegel mit den PCR-Produkten einer XBP1-PCR dargestellt. Eine klare Größendiskrepanz war nur in der Positivkontrolle nach 24 h Inkubation mit 10 μ M Thapsigargin zu erkennen, weder in den HCT116 DK p53 +/+, noch in den p53 -/- unter DK und Bestrahlung war dies nachweisbar.

Zur Überprüfung der PCR-Ergebnisse wurde ein Luziferase-Assay mit pFLAG-XBP1u-FLuc Plasmid durchgeführt, welches die transkriptionelle Aktivität des XBP1 Proteins im Nukleus

abbildet. Auch hier ließ sich nach 96 h KD-Induktion keine vermehrte Aktivität nachweisen. Dies zeigte, dass auch der zweite ER-Stress Sensor durch DK nicht aktiviert war und somit nicht für die Reduktion der Apoptose verantwortlich sein konnte (Abb. 12B).

A



B

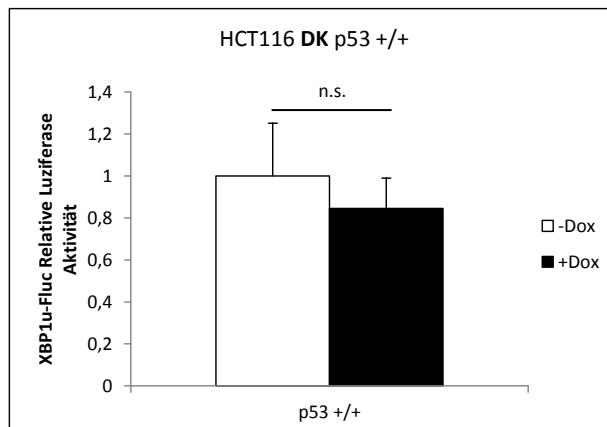


Abbildung 12: Der ER-Stress Sensor Ire1 ist nicht aktiv und damit nicht an der Reduktion der Apoptose beteiligt.

A) PCR-Agarosegele von HCT116 DK p53 +/+ und -/-. Sowohl mit als auch ohne Bestrahlung kam es nicht zur Bildung der Spleißvariante der XBP1-mRNA, was gegen eine Aktivierung von IRE1 spricht. Als Positivkontrolle diente Thapsigargin (=Thaps. 1 μ M, 24h). B) Luziferase-Assay mit pFLAG-XBP1u-Fluc Plasmid in HCT116 DK p53 +/+ Zellen. Nach 96 h Induktion war keine transkriptionale Aktivität von XBP1 im Nukleus nachweisbar.

3.8 PERK-Aktivität in HCT116 DK-Zellen

In dem vorangegangenen Projekt (Hussmann et al., 2015) konnte eine klare selektive Aktivierung von PERK durch Autophosphorylierung, eIF2 α Phosphorylierung, ATF4 und GADD34-Induktion nachgewiesen werden, die essenziell für die Induktion der Apoptose ist.

In Abbildung 13A sieht man einen Western Blot mit den Proteinen P-eIF2 α und ATF4 in HCT116 DK p53 +/+ Zellen nach 96 h KD-Induktion (n=3). Im Gegensatz zu den HCT116 shERp57 Zellen war keine vermehrte Phosphorylierung von eIF2 α und keine Induktion von ATF4 in den HCT116 DK-Zellen nachzuweisen.

Abbildung 13B zeigt noch einmal den direkten Vergleich der eIF2 α -Phosphorylierung an Ser51 zwischen HCT116 DK und shERp57 Zellen. Eine vermehrte Phosphorylierung zeigte sich nur in den HCT116 shERp57 Zellen.

Um die Rolle von PERK bei der Apoptose in den HCT116 DK-Zellen zu untersuchen, wurde der PERK-Inhibitor GSK 2606414 (Atkins et al., 2013) verwendet. In der Abbildung 13C sind vergleichend Caspase-3-Assays zwischen HCT116 DK und shERp57 Zellen dargestellt. In den DK-Zellen war unter 5 μ M PERK-Inhibitor und KD-Induktion keine signifikante Reduktion der Apoptose zu beobachten, während die shERp57 Zellen signifikant geringere Caspase-3-Werte unter PERK Inhibition aufwiesen (um ca. 66 %). Hier bestätigten sich die oben genannten Befunde aus den Western Blots. PERK ist in HCT116 DK-Zellen nicht aktiv und erklärt damit die im Vergleich zum ERp57-KD weniger ausgeprägte Apoptose.

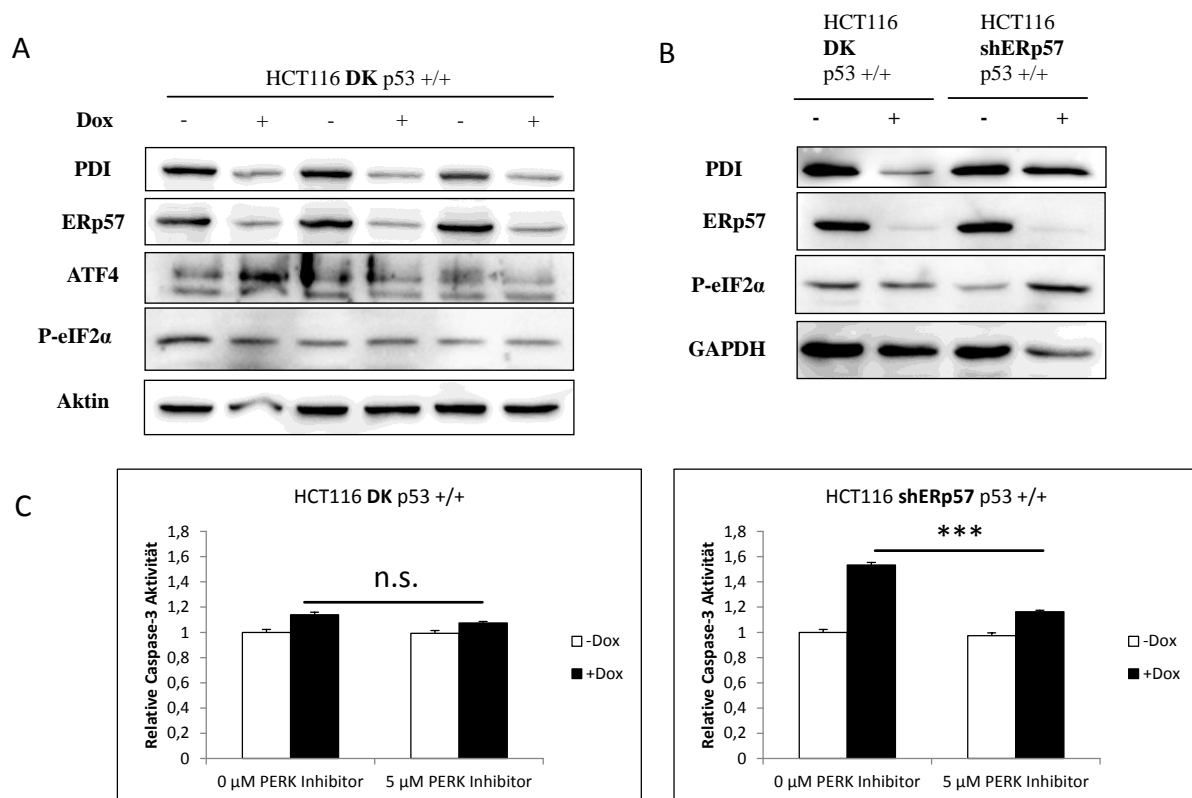


Abbildung 13: Der ER-Stress Sensor PERK ist in HCT116 DK-Zellen nicht aktiv.

A) In HCT116 DK-Zellen waren eIF2 α Phosphorylierung (Ser51), ATF4 und GADD34-Induktion nicht nachweisbar. Untersucht wurden ATF4, P-eIF2 α (Ser51), PDI, ERp57 und GAPDH an drei unabhängigen Probenpaaren. B) Direkter Vergleich der eIF2 α Phosphorylierung zwischen HCT116 DK und shERp57 Zellen. Vermehrte PERK-Aktivierung war nur in HCT116 shERp57 Zellen nachweisbar. C) Caspase-3-Assay mit PERK-Inhibitor (GSK 2606414), kein signifikanter Rückgang der Apoptose in HCT116 DK-Zellen. Reduktion der Apoptose in shERp57 Zellen bis auf das Niveau der DK-Zellen.

3.9 Vergleich von PDI shRNA und PDI siRNA

Um Artefakte in der Methodik mit lentiviraler Transduktion und shRNA auszuschließen, wurden zusätzlich Versuche mit siRNA (*small interfering RNA*) durchgeführt.

Abbildung 14 zeigt HCT116 shERp57 p53 +/+ Zellen ohne Transfektion (=Mock), nach Transfektion mit 100 nM siRNA gegen GFP (=Kontrolle) oder PDI. Teil A (Abb. 14) zeigt den KD durch siRNA im Western Blot, Teil B die densitometrische Auswertung des Verhältnisses von PDI zu Aktin mit einer KD Effizienz von ca. 50 %. In Abbildung 14C ist ein Caspase-Assay der HCT116 shERp57 p53 +/+ Zellen nach Transfektion mit siGFP oder siPDI dargestellt, zum Vergleich ist ein repräsentatives Ergebnis aus anderem Versuch nur mit ERp57-KD dargestellt. Wie schon mit shRNA gezeigt (s. 3.2), stieg die Caspase-3-Aktivität unter siRNA gegen PDI auf nur noch das 1,5-fache im Vergleich zur Kontrolle. Methodisches Artefakte durch Verwendung lentiviraler shRNA waren damit unwahrscheinlich.

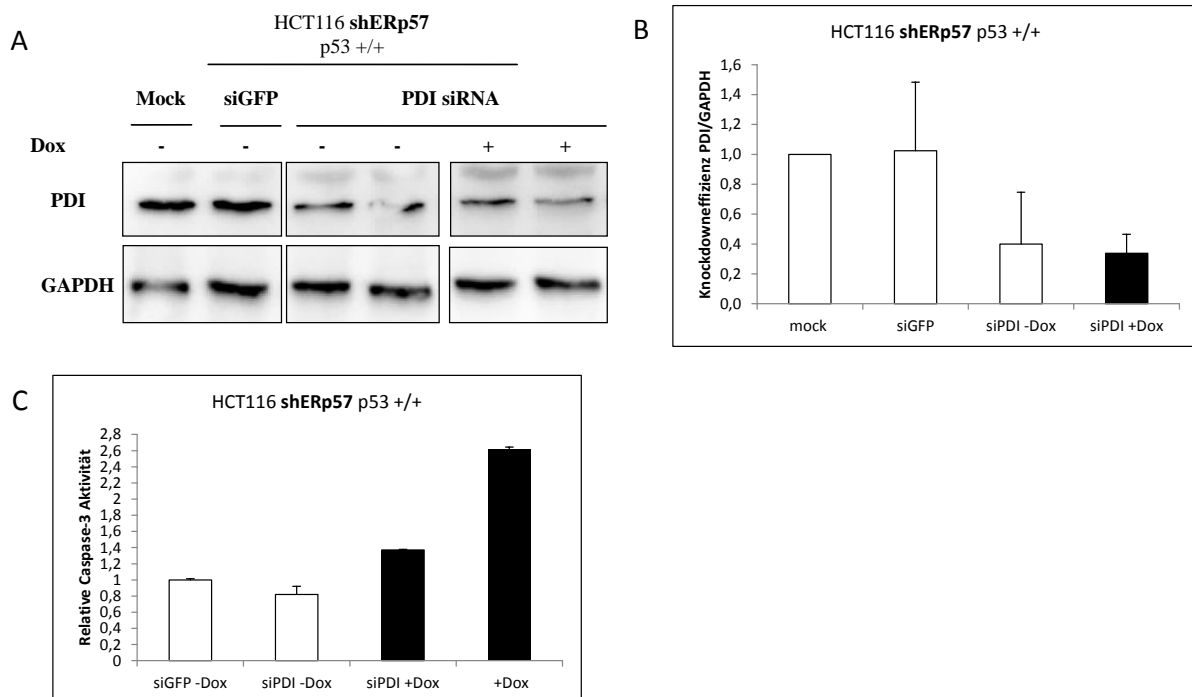


Abbildung 14: PDI siRNA bestätigt die Effekte mit shRNA.

A) Western Blots zeigen KD durch 100 nM siRNA gegen PDI (72h KD, 96 h nach Transfektion). B) Daneben densitometrische Auswertung der KD-Effizienz von PDI (ca. 50 %). C) Caspase-3-Assays zeigten eine massive Reduktion der Apoptose durch KD von PDI mittels siRNA in HCT116 shERp57 p53 +/+ Zellen und bestätigten damit die Ergebnisse der lentiviralen Konstrukte. siGFP wurde als Kontrolle genutzt (+Dox = repräsentatives Ergebnis aus anderem Versuch).

3.10 Proapoptotische Funktion von PDI

In 3.6-3.9 wurden konkrete Kompensationsmechanismen überprüft, die einen Rückgang der apoptotischen Aktivität durch zusätzliches Ausschalten von PDI erklären könnten. Diese waren alle in- oder nur marginal aktiv, PERK ist verglichen mit den HCT116 shERp57 sogar signifikant geringer aktiviert. Dies führte zu der Hypothese, dass PDI in HCT116 shERp57 p53 +/+ Zellen eine strukturelle oder funktionelle Rolle in der Aktivierung des ER-Stress Sensors PERK spielt, die durch einen zusätzlichen KD von PDI verhindert wird (s. 3.9). Um diese Hypothese zu prüfen, wurden HCT116 DK p53 +/+ Zellen mit GFP (=Mock), PDI Wildtyp Plasmid und PDI C400S Mutante (funktionsloses aktives Zentrum) transfiziert.

In Abbildung 15A ist ein Caspase-3-Assay nach Transfektion mit PDI WT und PDI C400S Mutante in HCT116 DK p53 +/+ dargestellt. Es zeigte sich ein Anstieg der Caspase-3-Aktivität um 10 % nach Transfektion mit PDI WT Plasmid und KD-Induktion, jedoch nicht mit der PDI C400S Mutante und KD-Induktion (leichter Anstieg sowohl ohne, als auch mit KD-Induktion). Der nur leichte Anstieg von 10 % ließ sich durch eine schwache Transfektionseffizienz von ebenfalls nur 10 % in den HCT116-Zellen erklären. Nichtsdestotrotz ließ sich auf Proteinebene eine starke Überexpression nachweisen (Abb. 15A). Dieser Versuch zeigte, dass PDI nicht im Sinne eines Strukturproteins, sondern enzymatisch an der Initiation der PERK-Aktivierung und damit an der Apoptoseinduktion beteiligt sein muss.

Da die Transfektionseffizienz nur 10 % betrug und die Effekte damit nur in einer kleinen Population nachgewiesen werden konnten, wurde zusätzlich zur Überexpression in HCT116 DK-Zellen Inhibitionsversuche mit dem PDI-Inhibitor 16F16 (Hoffstrom et al., 2010) in HCT116 shERp57 Zellen durchgeführt.

Abbildung 15C zeigt ein Caspase-3-Assay in HCT116 DK, shERp57 Zellen nach 96 h Induktion und HCT116 shERp57 Zellen mit 1 und 5 μ M 16F16. Man sah eine dosisabhängige Reduktion der Caspase-3-Aktivität durch Inhibition von PDI (von 3,5 auf 2,5 bzw. auf 2,0), auch wenn die Werte der DK-Zellen (1,8-fache Induktion) nicht ganz erreicht werden konnten. Zusätzlich zeigte sich hier erneut, dass PDI funktionell (Inhibitor blockiert aktives Zentrum) und nicht strukturell an der PERK-Aktivierung und folgenden Apoptoseinduktion beteiligt war.

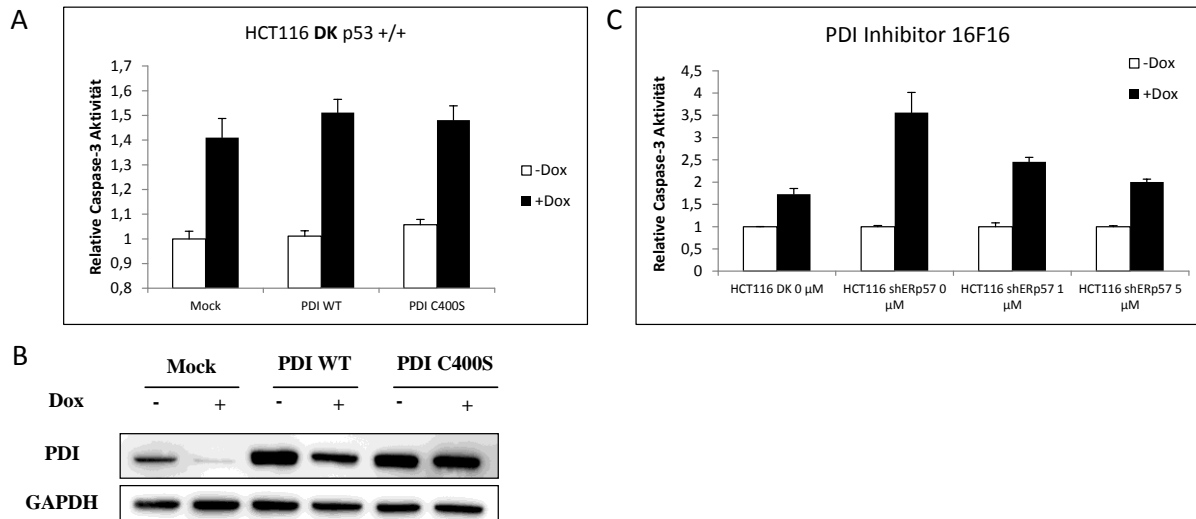


Abbildung 15: PDI ist funktionell für die Initiation der Apoptose in HCT116 shERp57 p53 +/- Zellen entscheidend.

A) Caspase-3-Assay in HCT116 DK-Zellen transfiziert mit Mock (GFP), PDI WT und PDI mutC400S (funktionell inaktiv) 96 h nach KD-Induktion und Transfektion. Es zeigte sich ein leichter Anstieg der Caspase-3-Aktivität nach Transfektion mit PDI WT und mutC400S Plasmid und Doxycyclin. Der Anstieg von ca. 10 % korrelierte mit der Transfektionseffizienz in HCT116. B) Western Blot korrespondierend zu A. C) Der PDI-Inhibitor 16F16 suppressierte dosisabhängig die Apoptose in HCT116 shERp57. Gezeigt ist ein Caspase-3-Assay in HCT116 shERp57 p53 +/- Zellen, behandelt mit DMSO (Kontrolle) bzw. 1 und 5 μM PDI-Inhibitor 16F16. Zu sehen war ein dosisabhängiger Rückgang der Caspase-3-Aktivität, was die Versuche mit gentechnischer Inaktivierung von PDI bestätigte.

3.11 Der Redoxstatus von PDI und PERK-Aktivierung

Wie in 3.8 dargestellt, zeigten die HCT116 DK im Vergleich zu den shERp57 Zellen keine Aktivierung des ER-Stress Sensors PERK, was sich in einer reduzierten Apoptoserate widerspiegelte (s. Abb. 13). Dieser Effekt konnte mit siRNA gegen PDI (s. Abb. 14), Überexpression von PDI WT in HCT116 DK-Zellen (s. Abb. 15), und chemischer Inhibition von PERK (s. Abb. 13C) und PDI (s. Abb. 15C) in shERp57 Zellen bestätigt werden.

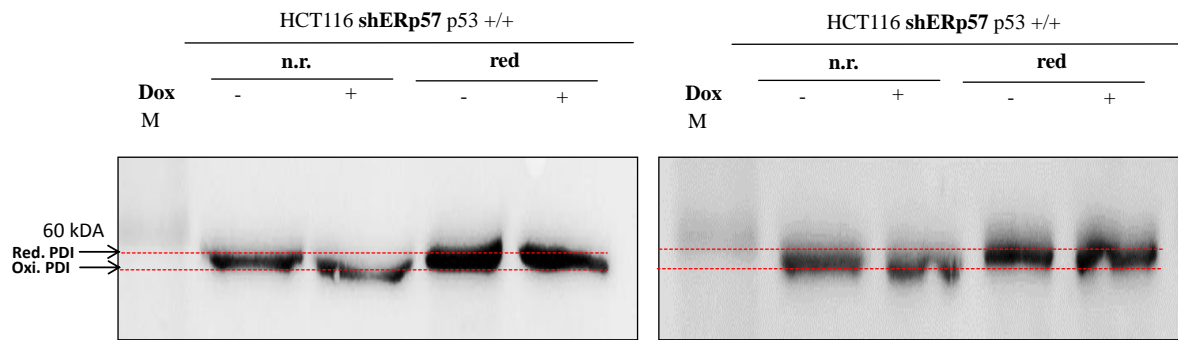
Des Weiteren war PDI scheinbar nicht strukturell, sondern funktionell entscheidend für die PERK-abhängige Apoptoseinduktion, da eine Überexpression der PDI C400S Mutante, die enzymatisch inaktiv ist, keine erhöhte Apoptoserate in DK-Zellen verursachte, chemische Inhibitoren von PDI (hemmen das aktive Zentrum) jedoch genauso zur Apoptosereduktion in HCT116 shERp57 Zellen führten, wie die lentivirale Reduktion der PDI-Expression (s. Abb. 15C)

Die funktionellen Zentren von PDI bestehen aus je zwei Cysteinen, welche sowohl reduziert als auch oxidiert vorliegen können. Oxidierte Proteine laufen in der nicht-reduzierenden SDS-Gelelektrophorese schneller als reduzierte, sodass sich bei Veränderungen des Redoxstatus ein Laufunterschied ergibt.

In Abbildung 16A sind nicht-reduzierte Proben aus HCT116 shERp57 Zellen reduzierten Proben gegenübergestellt. Unter KD von ERp57 ließ sich eine Zunahme der oxidierten Form von PDI nachweisen, die ein geringeres apparentes Molekulargewicht aufweist. Dieser Unterschied war bei der Nutzung von reduzierendem Puffer nicht nachweisbar. Zur Bestätigung wurden Maleimid-Assays durchgeführt, dabei zeigen die oxidierten Proteine durch die stattgehabte Alkylierungsreaktion der Cysteine mit MPEG ein höheres Molekulargewicht. Der KD von ERp57 führte hier, ähnlich wie die Positivkontrolle mit Diamid, zu einer massiven Zunahme des Molekulargewichts von PDI, was der oxidierten Form entspricht (Abb. 16B).

Dies bewies eine Verschiebung des Redoxstatus zur oxidierten Form von PDI durch ERp57-KD. Die Zusammenschau der Daten zeigte also, dass ERp57 *in vivo* als Reduktase von PDI wirkt. Lag PDI vermehrt oxidiert vor (z.B. durch verminderte ERp57 Proteinmengen), wurde PERK aktiviert. Entfernte man diese oxidierte Form von PDI aus dem System, oder blockierte PDI chemisch, führte dies zu einer verminderten Aktivierung von PERK und damit zu verringerten Apoptoseraten.

A



B

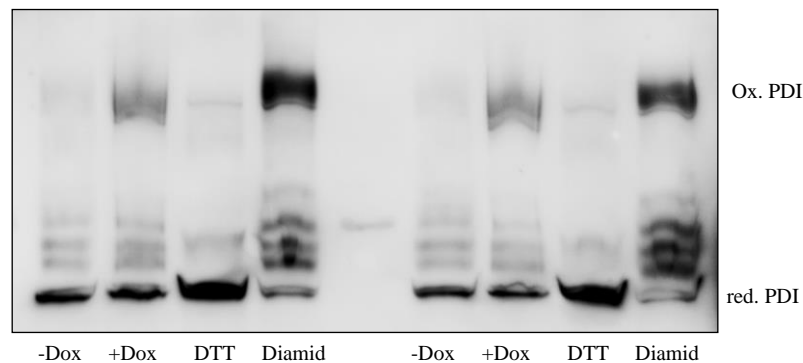


Abbildung 16: ERp57 reduziert PDI.

A) Western Blot von HCT116 shERp57 p53 +/+ Zellen mit $n=2$, ersten zwei Spuren nicht-reduzierend (= n.r.) und zum Vergleich Spur 3 und 4 reduzierend (= red.). Unter ERp57-KD lässt sich eine vermehrt oxidierte Form von PDI nachweisen, die bei Verwendung von reduzierendem SDS-Puffer nicht nachweisbar ist. (M=Marker). B) Maleimid-Assay in HCT116 shERp57 p53 +/+ Zellen. DTT diente als Negativ-, Diamid als Positivkontrolle.

3.12 Die Rolle von PDI in der PERK-Aktivierung unter globalem ER-Stress

Nachdem gezeigt wurde, dass PDI unter ERp57-KD für die PERK-Aktivierung verantwortlich war, wurde überprüft, ob dieser Mechanismus nur unter ERp57-KD stattfindet oder ob auch bei globalem ER-Stress funktionales PDI für eine suffiziente PERK-Aktivierung benötigt wird. Um dies zu überprüfen, wurden HCT116 shPDI Zellen generiert und zusammen mit dem SERCA Hemmstoff Thapsigargin ($2 \mu\text{M}$ für 24h) inkubiert. Durch Thapsigargin sinkt die Calciumkonzentration im ER, was zu einer globalen ER-Stress Antwort führt.

In Abbildung 17 ist ein Western Blot in HCT116 shPDI Zellen dargestellt, durch KD von PDI sank die Menge des phosphorylierten eIF2 α an Serin 51 unter Thapsigargin-Behandlung

massiv ab. Die PARP-Spaltung zeigte jedoch eine stärkere Caspase-3-Aktivität in PDI-KD-Zellen nach Inkubation mit Thapsigargin. Dieses Ergebnis belegte, dass die Phosphorylierung von eIF2 α unter Thapsigargin die Zelle vor der Apoptoseeinleitung schützt.

Unter ERp57-KD lag PDI vermehrt oxidiert vor, was folgend zur Aktivierung von PERK führte. Die Autophosphorylierung von PERK durch Thapsigargin war durch PDI-KD ebenfalls stark eingeschränkt (Abb. 18A), was sich in einer reduzierten eIF2 α Phosphorylierung und einer mangelnden ATF4-Induktion bemerkbar machte (Abb. 18B). Diese Ergebnisse demonstrierten eine PDI-Abhängigkeit der PERK-Aktivierung auch unter globalem ER-Stress.

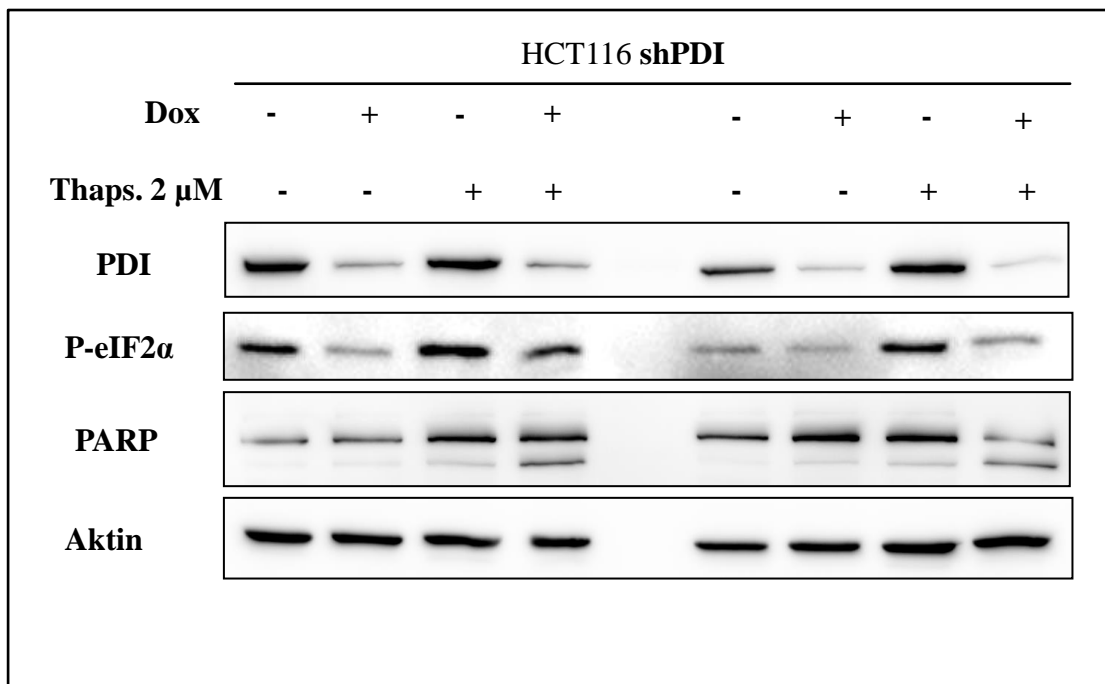


Abbildung 17: PDI ist auch unter globalem ER-Stress entscheidend für die PERK-Aktivierung.

Western Blot von HCT116 shPDI Proben. Die Phosphorylierung von eIF2 α war unter PDI-KD und Thapsigargin (=Thaps.) eingeschränkt. Der protektive Effekt war dadurch vermindert und die Zellen reagierten vulnerabler auf ER-Stress.

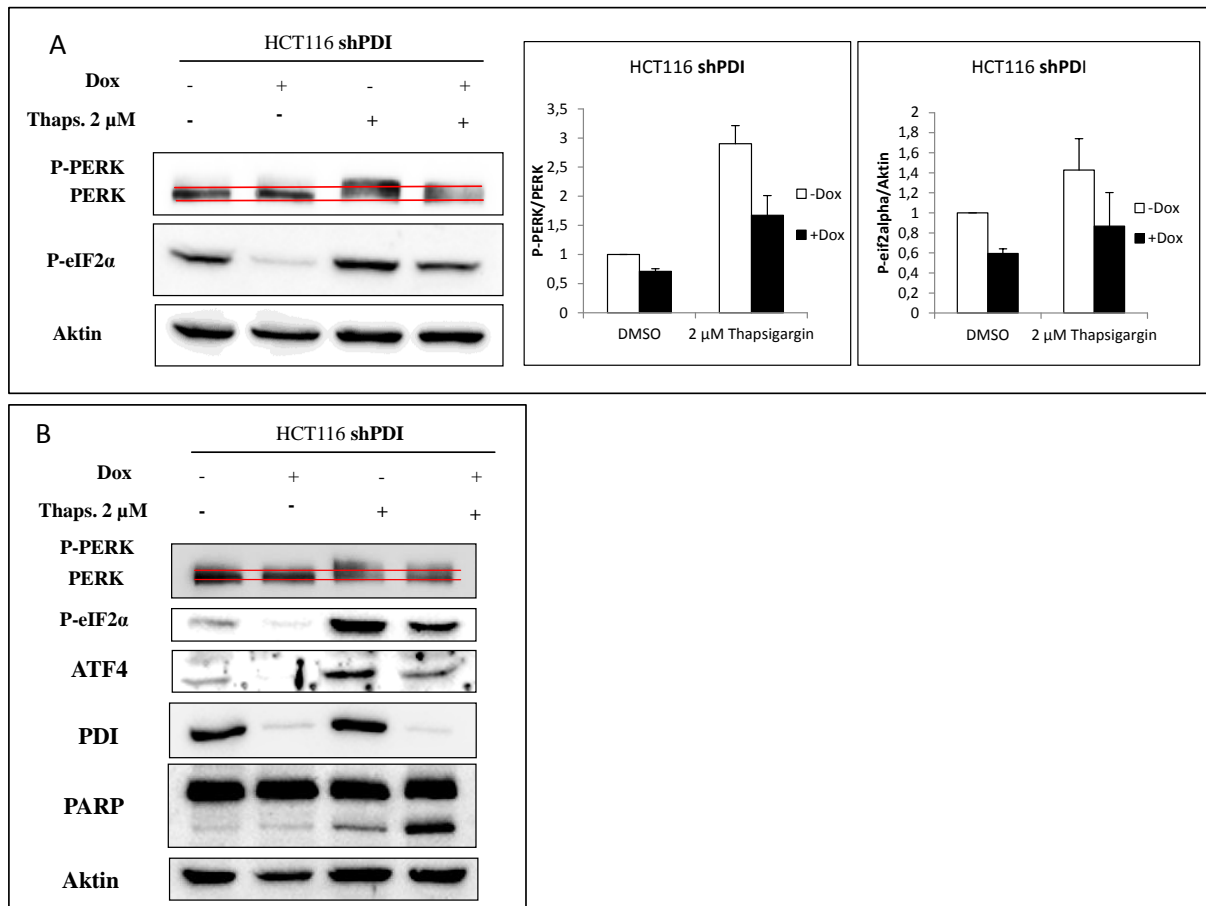


Abbildung 18: PDI und PERK-Aktivierung unter globalem ER-Stress.

A) Western Blot von HCT116 shPDI Proben. Die Phosphorylierung von eIF2 α und PERK war unter PDI-KD und Thapsigargin-Behandlung (=Thaps.) eingeschränkt. Rechts daneben densitometrische Auswertung mit n=2. B) Western Blot aus HCT116 shPDI Zellen. Unter Thapsigargin war eine geringere Aktivierung von PERK, geringere Phosphorylierung von eIF2 α und keine Induktion von ATF4 nachweisbar, wenn PDI deletiert ist. Des Weiteren zeigte die PARP-Spaltung vermehrte Apoptose.

4. Diskussion

ER-Oxidoreduktasen erregen aufgrund möglicher therapeutischer Angriffsziele hohes wissenschaftliches Interesse auf dem Gebiet der Tumor- und Neurodegenerations-Forschung. Wegen der vielfältigen Funktionen (Oxidoreduktase, Chaperonfunktion) und Lokalisationen (ER, Zellmembran, Zytoplasma, Nukleus) dieser Proteine, existieren unterschiedlichste Forschungsansätze und zum Teil kontroverse Ergebnisse. Verschiedene Studien konnten einen apoptotischen Phänotyp nach KD von ER-Oxidoreduktasen nachweisen, der durch diese Studie erneut bestätigt werden konnte (Hashida et al., 2011; Hussmann et al., 2015). Nichtsdestotrotz gibt es Studien, die der Depletion von ERp57 oder PDI einen zytoprotektiven Effekt, vorallem in neuronalen Zellmodellen, bescheinigen (Wang et al., 2012b). Die Effekte scheinen dabei stark gewebe- und stimulusspezifisch zu sein, wobei die molekularen Hintergründe nach wie vor weitgehend unklar sind.

In der Tumorforschung zeigt die pharmakologische oder gentechnische Blockade von PDI oder ERp57, analog zu dieser Studie, zumeist antitumoröse Aktivität. So konnte in einer Studie das Tumorwachstum von Ovarialkarzinomzellen in Xenograft-Modellen durch den PDI-Inhibitor PACMA31 reduziert werden (Xu et al., 2012). Ein ähnlicher Effekt konnte in Zellkulturen von Ovarialtumorzellen in Kombination mit Cisplatin erreicht werden. Der KD von ERp57 hatte hingegen keinen Einfluss auf die Cisplatinsensitivität (Kullmann et al., 2015). Ein zytotoxischer Effekt ist jedoch nicht in allen Zelllinien nachweisbar. Während der KD von PDI in SH-SY5Y (Glioblastom) und MCF7 (Mamma-Karzinom) Zellen die Zellviabilität verringert, zeigt sich kein Effekt auf HeLa Zellen (Zervixkarzinom). Des Weiteren konnte in der Studie nur in MCF7 Zellen Apoptose nachgewiesen werden. Eine molekulare Ursache für die Zelltypspezifität ist bislang nicht bekannt (Hashida et al., 2011).

In dieser Studie zeigte sich in HCT116-Zellen hingegen ein anderes Bild: Während der KD von ERp57 Apoptose auslöste, verhinderte eine zusätzliche Depletion von PDI diesen Phänotyp. Ein alleiniger KD von PDI hatte dagegen keine Apoptoseinduktion zur Folge. In dieser Studie konnte zum ersten Mal ein rationaler Ansatz für die Diversität der Phänotypen nach PDI oder ERp57-KD aufgedeckt werden. Die Depletion von ERp57 führte zu einer selektiven PERK-Aktivierung mit folgender p53-Aktivierung und Apoptoseinduktion. Wurde zusätzlich PDI ausgeschaltet, zeigte sich die PERK-Aktivierung vermindert und der apoptotische Phänotyp wurde unterdrückt. Tatsächlich konnten zu diesem Zeitpunkt keine Publikationen gefunden werden, die nach Depletion von PDI die Aktivität von PERK charakterisieren. Es erscheint möglich, dass Zellen, die eine hohe Hintergrund PERK-

Aktivität besitzen, durch Depletion von PDI diese Aktivität einbüßen und den Zelltod einleiten. Zellen, die keine hohe PERK-Aktivität benötigen, verkraften die Depletion hingegen besser und reagieren erst apoptotisch nach zusätzlicher, exogener ER-Stress-Induktion. Gerade in neuronalen Zellen könnte dies erklären, warum eine PDI Depletion/Inhibition einen protektiven Effekt hat (Hoffstrom et al., 2010): Fehlt PDI, fehlt die PERK-Aktivierung und die damit verbundene CHOP abhängige Apoptose – die Neurone überleben. Natürlich ist nicht auszuschließen, dass die Beeinträchtigung des Faltungsapparates eine Rolle spielt. Da jedoch die DK-Zellen mit geringerer Faltungskapazität durch den Verlust zweier Oxidoreduktasen einen milderen Phänotyp zeigten, als die ERp57-KD-Zellen, erscheint diese Erklärung zumindest unwahrscheinlich.

Eine PERK-Aktivierung muss aber nicht zwangsläufig in einem apoptotischen Phänotyp münden. Es existieren einige Studien, die eine PERK-Aktivierung mit erhöhten Apoptoseraten in Verbindung bringen (Jiang et al., 2014; Li et al., 2006), unter anderem über die Transkription von PUMA und die Modulation von p38. Nichtsdestotrotz scheint PERK unter Thapsigargin-Behandlung über den vermittelten Translationsstop und eine ATF4-Induktion primär zytoprotektiv zu wirken (Teske et al., 2011) (s. 3.13). Wie der Wechsel von Zytoprotektion zu Apoptose vollzogen wird, bzw. die primäre PERK-Antwort apoptotisch oder zytoprotektiv sein kann, ist bis heute noch unklar. Es gibt Indizien, dass nach länger anhaltendem ER-Stress, GADD34 eIF2 α dephosphoryliert und es durch die folgende Proteinüberladung am ER zur Apoptoseinduktion kommt. Dies erklärt allerdings nicht, wie auch eine primäre PERK-Aktivierung bei starker eIF2 α -Phosphorylierung zur Apoptose führen kann, oder wie und wann PERK Apoptose bzw. Überleben induziert.

Eine p53-Aktivierung unter ER-Stress ist mittlerweile bekannt und passt zu dieser Studie. In embryonalen Maus-Fibroblasten mündet der Knockout von p53 in einer verminderten Apoptose nach Behandlung mit Thapsigargin (Li et al., 2006). Für die p53-Aktivierung wird unter anderem Nf κ B verantwortlich gemacht (Lin et al., 2012). Auch wir konnten die p53-Abhängigkeit hier und in einer vorangegangenen Studie bestätigen, jedoch führten wir die p53-Aktivierung eher auf eine beschriebene direkte Interaktion des Tumorsuppressors mit GADD34 zurück (Husmann et al., 2015; Yagi et al., 2003). Eine Kopplung von ER-Stress und p53-induzierter Apoptose ergibt auch aus physiologischer Sicht Sinn: Oxidativer Stress im ER kann zu DNA-Schäden führen und umgekehrt wird für die DNA-Reparatur das ER zur Produktion von Reparaturfaktoren benötigt. Es mehren sich die Beweise, dass das ER und die DNA-Synthese/Reparatur synergistisch arbeiten. So zeigte sich in einer Studie, dass eine Aktivierung von PERK während ER-Stress Episoden über die Proteine Claspin und CHK1

(*Checkpoint kinase 1*) die DNA-Synthese und somit die Proliferation hemmt (Cabrera et al., 2016).

Der Einfluss von Oxidoreduktasen auf ER-Stress Antwort ist nach wie vor ein viel beforschtes Gebiet. Hinsichtlich des therapeutischen Nutzens ist es unentbehrlich zu Verstehen in welchen Situationen und über welche Signalkaskaden diese Proteine einen Überlebensvorteil bieten bzw. zytotoxische Wirkung entfalten. Während in neuronalen Systemen vornehmlich zytoprotektive Wirkungen benötigt werden (Apoplex, neurodegenerative Erkrankungen), ist in der Erforschung von Tumorthérapien ein zytotoxischer Effekt gewünscht.

Der KD von ERp57 führt zu einem G2-Arrest (Hussmann et al., 2015), welcher in kombiniertem KD von ERp57 und PDI nicht mehr nachweisbar war. Dies ließ auf eine PERK-Abhängigkeit schließen, da PERK nur in ERp57-KD-Zellen aktiv zu sein scheint. Auch aus physiologischer Sicht macht es Sinn, bei PERK-Aktivität die Progression des Zellzyklus zu stoppen, um eine ideale Faltungskapazität, Proteinbiosynthese und ausreichende Nährstoffversorgung der beiden Tochterzellen zu gewährleisten. Die Gruppe um Bourougaa et al. konnten dafür eine alternative, verkürzte p53-mRNA (p47) verantwortlich machen, die bei einem durch PERK-verursachten Translationsstop, präferiert translatiert wird. Dieses p47 Protein induziert 14-3-3 σ , welches den Übertritt von der G2- in die M-Phase blockiert (Bourougaa et al., 2010).

ER-Stress und die darauf eingeleitete UPR können jedoch auch in einem G1-Arrest resultieren. So reagieren Melanomzellen nach Tunicamycin-Behandlung durch eine Stabilisierung von p27 (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*) mit einem G1-Arrest, der durch KD von p27 reversibel ist (Han et al., 2013). Darüber hinaus gibt es Evidenz, dass durch den ER-Stressor Tunicamycin ausgelösten Translationsstop das Protein Cyclin D1 vermindert gebildet wird und die Zellen den G1-S Checkpoint daher nicht passieren können (Brewer et al., 1999). Brewer et al. konnten für diesen Phänotyp ebenfalls PERK als zentralen Mediator identifizieren: Die Expression einer dominant negativen Form von PERK (fehlende Kinase-Domäne) resultiert in normaler Zellzyklusprogression unter ER-Stress (Brewer & Diehl, 2000).

Wie PERK-Aktivität bzw. das Zusammenspiel anderer Arme der UPR letztlich in unterschiedlichen Zellzyklusphasen zum Arrest führen kann, ist bislang nicht beschrieben. IRE1 kontrolliert über XBP1 unter anderem die Translation von Cyclin A und XBP1-Überexpression führt zu einer gesteigerten Proliferationsrate. Ob dies jedoch mit einer

Zellzyklusregulation zusammenhängt oder eher durch gesteigerte ER-Kapazitäten bedingt ist, ist nicht klar (Thorpe & Schwarze, 2010). Zur Beteiligung von ATF6 ist zurzeit wenig bekannt. Eine Studie in Maus-Granulosazellen zeigt, dass der KD von ATF6 einen S-Phase-Arrest auslöst (Xiong & Chen, 2017).

Die verschiedenen Phänotypen lassen auch hier die Vermutung zu, dass PERK präziser reguliert wird als bislang bekannt ist. Der KD von ERp57 führt zu einem reinen G2-Arrest, wieso es aber durch den klar nachgewiesenen Translationsstop nicht zusätzlich zu einem G1-Arrest über verminderte Cyclin D1 Level kommt, konnte auch hier noch nicht geklärt werden.

ER-Stress und der Einfluss auf die Bestrahlungsresistenz wurde in unterschiedlichsten Studiendesigns adressiert. In dieser Studie konnte erneut gezeigt werden, dass der KD von ERp57 über einen PERK-abhängigen Signalweg in einer erhöhten Apoptoserate und geringeren Proliferationsfähigkeit von HCT116-Zellen mündete. Auch die DK-Zellen zeigen eine verringerte Proliferation nach Bestrahlung, die jedoch PERK- und Apoptose-unabhängig war.

Ein ähnlicher Phänotyp kann in Brustkrebszellen (MDA-MB-231) nachgewiesen werden: Wird PERK mittels siRNA ausgeschaltet, steigt das klonogene Überleben und die Apoptoserate geht zurück. Die Bestrahlung selber löste hier keinen ER-Stress aus (Oommen & Prise, 2013).

Yamamori et al. zeigen, dass ER-Stress unter ionisierender Bestrahlung durch vermehrte Degradation von Rad51 (*DNA repair protein RAD51*) die DNA-Doppelstrangbruchreparatur beeinträchtigt und die Zellen so vulnerabler auf Bestrahlung reagieren (Yamamori et al., 2013). Auch eine zusätzliche Behandlung mit Tunicamycin sensitiviert Oesophagus-Karzinomzellen für ionisierende Strahlung (Pang et al., 2013).

Einige Autoren beschreiben, dass Bestrahlung selbst ER-Stress auslöst und zytotoxisch wirkt. So wurde nachgewiesen, dass humane pulmonalarterielle Endothelzellen nach Bestrahlung einen apoptotischen ER-Stress Phänotyp zeigen und der eIF2 α -Dephosphorylase-Inhibitor Salubrinal diesen um 50 % reduzieren konnte (Panganiban et al., 2013). Zhang et al. konnten bestätigen, dass auch in epithelialen Rattenzellen (IEC-6) nach Bestrahlung ER-Stress nachweisbar ist (Zhang et al., 2010).

Kontrovers dazu postuliert eine aktuelle Untersuchung, dass ER-Stress protektiv auf bestrahlte Schilddrüsenkarzinome wirkt. Zellen, die vor der Bestrahlung entweder mit

Thapsigargin oder Tunicamycin behandelt werden, zeigen weniger Apoptose bei verringerter CHOP-Expression und ein verstärktes klonogenes Überleben (Wu et al., 2015).

Die Diversität der Behandlung (Salubrinal, Thapsigargin, Tunicamycin, siRNA, Grayzahl), die verschiedenen genutzten Zelllinien und die hochkomplexe Regulation der UPR, machen eine abschließende Bewertung dieses Forschungsfeldes schwierig. Viel deutet daraufhin, dass ER-Stress Zellen für ionisierende Strahlung sensibilisiert. So auch in dieser Studie, die durch ERp57-KD ausgelöste PERK-Aktivierung führte nach Bestrahlung zu erhöhten Apoptoseraten. Wurde die PERK-Aktivität durch zusätzlichen PDI-KD gehemmt, zeigten die Zellen keine Steigerung der Apoptoserate nach Bestrahlung. Da dies allerdings stark zelltypspezifisch zu sein scheint, sind weitere Untersuchungen in klar definierten Versuchsaufbauten von Nöten, um die Rolle von ER-Stress und den einzelnen Armen der UPR während der Bestrahlung abschließend aufzuklären.

In einer vorangegangenen Studie konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass HCT116-Zellen mit ERp57-KD nicht nur Apoptose, sondern auch eine verringerte Proliferationsrate zeigten (Hussmann et al., 2015). Ursächlich hierfür fanden wir eine verminderte Phosphorylierung an zentralen Knotenpunkten der Proliferationsregulation wie mTORC1 und p70S6-Kinase (*Ribosomal protein S6 kinase beta-1*) und führten dies auf eine Instabilität im mTOR1-Komplex durch fehlendes ERp57 zurück (Ramirez-Rangel et al., 2011). Untersuchungen an Brustkrebszellen legen nahe, dass ERp57 an der Internalisierung und Phosphorylierung des EGF-Rezeptor beteiligt ist und auch möglicherweise hierüber einen Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit hat (Gaucci et al., 2013).

Auch die DK-Zellen zeigen einen starken Proliferationsrückgang und Viabilitätsverlust, jedoch ohne PERK-Aktivierung, was einen zusätzlichen, PERK-unabhängigen Proliferationsstop wie auch in den ERp57-KD-Zellen suggeriert. Der milde Phänotyp der PDI-KD-Zellen ließ vermuten, dass hauptsächlich ERp57 an der Proliferationsregulation beteiligt war. Wie ERp57 allerdings auf molekularer Ebene agiert und auf welche zentralen Spieler der Proliferationsregulation es direkten Einfluss nimmt, ist Gegenstand einer laufenden Untersuchung in unserem Labor.

Dass PDI trotz des milden Phänotyps eine zentrale Rolle in der Proliferation und Adaptation an zellulären Stress spielt, zeigten die Versuche mit PDI-KD in Kombination mit Thapsigargin-Behandlung. Hierfür war aber wahrscheinlich in erster Linie die fehlende PERK-Aktivität nach PDI-KD ausschlaggebend und weniger die Destabilisierung zyttoplasmatischer Proliferationsfaktoren. Dass die Depletion von PDI jedoch die

Zellviabilität ebenfalls einschränken kann, ist bereits mehrfach beschrieben, eine molekularbiologische Erklärung steht allerdings noch aus (Hashida et al., 2011; Xu et al., 2012).

Das klassische Modell des Redoxsystems im ER besagt, dass die ER-Oxidoreduktasen sich in einem linearen System, an dessen Ende ERO1 steht, regenerieren. Neuere Untersuchungen können allerdings belegen, dass es durchaus Querverbindungen gibt, die eine Regeneration bzw. Disulfidaustausch der Oxidoreduktasen auch ohne Ero1 ermöglichen.

So konnten Kimura et al. zeigen, dass ERp57 direkt mit PDI interagiert (Kimura et al., 2005) und *in vitro* Studien belegen, dass ERp57 durch PDI oxidiert wird, bzw. im Umkehrschluss und in Einklang mit unseren Ergebnissen, PDI durch ERp57 reduziert wird (Oka et al., 2015).

PDI liegt in der Zelle primär reduziert vor (Appenzeller-Herzog & Ellgaard, 2008; Jessop & Bulleid, 2004). In der vorliegenden Studie konnte experimentell belegt werden, dass ERp57 als Reduktase für PDI fungiert. Darüber hinaus zeigen wir zum ersten Mal, dass der Disulfidaustausch zwischen Oxidoreduktasen eine physiologische Relevanz besitzt und dies nicht nur in der Proteinfaltung von Bedeutung zu sein scheint, sondern auch direkten Einfluss auf die Aktivität des UPR-Sensors PERK hat.

Das Standardmodell der UPR geht von einer Aktivierung aller ER-Stresssensoren, also PERK, ATF6 und IRE1 aus. Unter Behandlung mit ER-Stress induzierenden Reagenzien wie Thapsigargin, Tunicamycin und DTT lässt sich dies auch bestätigen. Neue Erkenntnisse belegen jedoch, dass zB. unter Bortezomib-Behandlung die PERK-Aktivierung in Pankreaskarzinomzellen ausbleibt und vornehmlich ATF6 und IRE1 aktiv sind (Nawrocki et al., 2005). Auch in dieser Studie zeigte sich, dass nicht zwangsläufig alle drei Arme der UPR aktiv sind. Durch ERp57-KD ließ sich eine selektive PERK-Aktivierung nachweisen, während IRE1 und ATF6 inaktiv oder nur marginal aktiv waren.

Berücksichtigt man diese Ergebnisse, ist es fraglich, ob die chemische ER-Stress-Induktion ideal ist, um die physiologische Relevanz der UPR zu überprüfen. Es ist wahrscheinlich, dass *in vivo* verschiedene Arten von Stress (Hypoxie, Glucosemangel, Aminosäurenmangel) auch zu einer unterschiedlich starken Aktivierung der einzelnen UPR-Arme mit diversen Folgen (Apoptose, Überleben) führt. Bislang gibt es einen chemischen Ansatz, der selektiv ATF6 aktiviert und so ermöglicht die Funktion getrennt von PERK und IRE1 zu bewerten (Plate et al., 2016). Dies ermöglicht zwar die Studie der Folgen einer ATF6-Aktivierung, gibt aber keinen Aufschluss über die molekularen Hintergründe einer physiologischen Aktivierung.

Der KD von ERp57 in HCT116-Zellen hingegen eignete sich gut, um eine reine PERK-Aktivierung und dessen Folgen zu evaluieren. Allerdings hat auch dieses Modell Grenzen: Durch die vielfältigen Einflüsse auf die Proliferation, den Zellzyklus und den Faltungsapparat können auch hier Nebeneffekte auftreten, die zu falschen Schlüssen führen. So schien PERK nicht für den Proliferationsstop in DK-Zellen verantwortlich zu sein, allerdings schon für den oben beschriebenen G2-Arrest in ERp57-KD-Zellen. Eine vorsichtige Bewertung unter Zusammenahme aller Ergebnisse ist auch hier unentbehrlich.

Welche Art von Stress in welchem Zelltyp verschiedene Arme der UPR aktiviert, ist Gegenstand aktueller Forschung. Vieles deutet daraufhin, dass Zellen die UPR viel genauer regulieren als bislang vermutet. Insbesondere die luminal Regulation über Oxidoreduktasen bzw. Redoxreaktionen scheint hier eine größere Rolle zu spielen.

In den vergangenen Jahren sind einige Studien zur luminalen Regulation der ER-Stress Sensoren IRE1 und ATF6 durch ER-Oxidoreduktasen bzw. Redoxreaktionen erschienen. So konnte gezeigt werden, dass ATF6 in ungestressten Zellen als Dimer und Oligomer über luminal Disulfidbrücken vorliegt. Unter ER-Stress werden die luminalen Cysteine reduziert und das anschließend monomer vorliegende ATF6 zum Golgi-Apparat transportiert. Reduzierende Agenzien wie DTT lösen diese Reaktion am stärksten aus, wie diese Regulation jedoch unter Thapsigargin- oder Tunicamycin-Behandlung funktioniert, ist bis heute noch nicht abschließend geklärt (Nadanaka et al., 2007; Sato et al., 2011). Es ist publiziert, dass PDIA5 durch Neuordnung der Cysteine in ATF6 einen entscheidenden Beitrag zur Aktivierung des ER-Stress Sensors leistet (Higa et al., 2014).

Eletto et al. zeigen, dass PDIA6 die Dauer der IRE1-Aktivierung über eine direkte Bindung an Cystein 148 limitiert. Ist IRE1 aktiv, wird dieses Cystein oxidiert und die Bindung an PDIA6 verhindert. PDIA6 defiziente Zellen zeigen daher eine verlängerte IRE1-Aktivierung unter ER-Stress. Eine Bindung von PDIA6 an PERK konnte ebenfalls nachgewiesen werden, die funktionelle Bedeutung bleibt jedoch unklar (Eletto et al., 2014).

PERK besitzt 4 Cysteine, deren Funktion bislang nicht geklärt ist. Dass die beiden anderen Stresssensoren IRE1 und ATF6 in gewisser Weise durch den Redoxstatus ihrer Cysteine reguliert werden, lässt einen ähnlichen Mechanismus bei PERK vermuten. Die Ergebnisse dieser Studie lassen den Schluss zu, dass PDI direkt oder indirekt an der Regulation von PERK beteiligt und für die Aktivierung essenziell ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass PDI nur eine Zwischenstation in der komplexen Redoxregulation der ER-Stresssensoren darstellt. Unsere zahlreich durchgeführten Co-Immunopräzipitationsversuche (Daten nicht

gezeigt) zeigten inkonsistente Ergebnisse mit teilweiser schwacher Interaktion von PERK und PDI, die sich auch durch Überexpression beider Proteine nicht verbessern ließ. Es ist daher von einer transienten Bindung bzw. einem indirekten Einfluss von PDI auf PERK auszugehen.

Auch ob die PERK-Aktivität mit dem Redoxstatus der Cysteine zusammenhängt, erfordert noch weitergehende experimentelle Untersuchungen. Maleimid-Assays nach Gabe von ER-Stressoren könnten über die Konfiguration der PERK-Cysteine weiteren Aufschluss geben.

Um die nachgewiesenen Effekte noch einmal zusammenzufassen, wurde ein Übersichtsbild erstellt.

Abbildung 19 zeigt die Abläufe in HCT116-Zellen. Nach KD von ERp57 akkumulierte PDI in oxidierte Form, was über einen bisher unbekannten Mechanismus zu einer PERK-Autophosphorylierung führte. PERK wiederum phosphorylierte eIF2 α an Serin 51, wodurch ein globaler Translationsstop ausgelöst wurde und Zielgene wie ATF4 präferiert translatiert wurden. ATF4 agierte anschließend als Transkriptionsfaktor im Nukleus und induzierte GADD34. Darauf folgte eine p53-Phosphorylierung an Serin 15 mit folgender Aktivierung des Tumorsuppressor, welcher über sein Zielgen PUMA die Apoptose in Gang setzte.

In HCT116 DK-Zellen fehlten sowohl ERp57, als auch PDI. Somit kam es nicht zur Akkumulation von oxidiertem PDI und daher auch nicht zur Aktivierung des UPR-Sensors PERK. Die oben beschriebene Kaskade über eIF2 α und ATF4 lief nicht ab. Nichtsdestotrotz konnte eine gewisse Aktivierung von p53 und eine geringfügige Apoptoseinduktion gezeigt werden, die einen weiteren, von PERK unabhängigen Mechanismus implizierte, der in dieser Studie nicht aufgeklärt werden konnte.

Unter Thapsigargin-Behandlung kam es zu einem Abfall der Calciumkonzentration innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums. PDI reagierte als calciumbindendes Protein daraufhin mit einer veränderten Stabilität und diente als Sensor für die PERK-Aktivierung. Depletiert man PDI unter Thapsigargin-Behandlung, fand nur noch eine eingeschränkte Aktivierung von PERK statt und die Zellen waren vulnerabler gegenüber ER-Stressoren, da der protektive Effekt von ATF4 und der eIF2 α -Phosphorylierung entfiel.

Diese Ergebnisse implizierten, dass PDI posttranslational verändert wird und diese Veränderungen Sensorfunktionen übernehmen, die letztlich zur Aktivierung der UPR über PERK führte. Zusätzlich zeigte sich, dass die Art der PDI-Modifikationen durchaus zu

unterschiedlichen Ergebnissen führen kann: Oxidiertes PDI schien eine proapoptotische PERK-Signalkaskade zu induzieren, während eine Störung der Calciumkonzentration eher einen protektive PERK-Aktivierung zur Folge hatte.

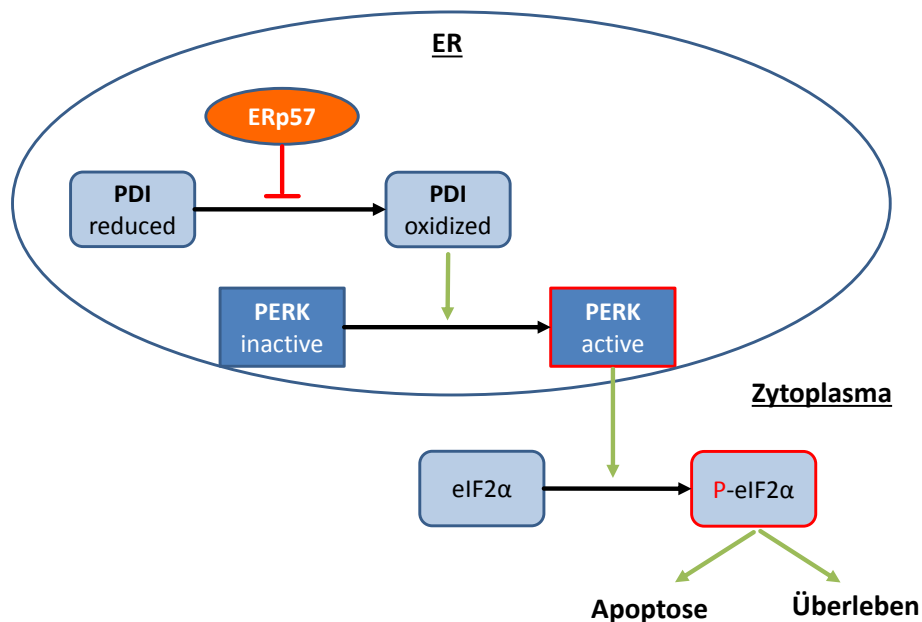


Abbildung 19: Überblick über die molekularen Abläufe

roter Balken = Inhibition, grüner Pfeil = Aktivierung, roter Rahmen = Phosphorylierung

Präklinische Studien, die sich mit der chemischen Inhibition von PERK befassen, konnten exzellente antitumoröse Effekte sowie neuroprotektive Wirkungen in Xenograft-Modellen nachweisen (Atkins et al., 2013; Moreno et al., 2013). Jedoch führt die Inhibition von PERK zu schwerwiegenden pankreatischen Nebenwirkungen in Form eines Wolcott-Rallison Syndroms (Diabetes Mellitus, Wachstumsretardierung) (Atkins et al., 2013), welche zwar mit einer zusätzlichen Anti-Interferon Therapie umgangen werden können, aber den Einsatz limitieren (Yu et al., 2015). Eine aktuelle Studie zeigt darüber hinaus, dass die verwendeten PERK-Inhibitoren zusätzlich potente RIPK1-Inhibitoren (*Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*) sind und somit unabhängig von PERK die Apoptoseinduktion verhindern können. Dies schränkt die Aussagekraft der oben genannten Studien ein (Rojas-Rivera et al., 2017).

Die Inhibition von PDI hingegen scheint keine schwerwiegenden Nebenwirkungen zu verursachen und zeigt ebenfalls eine exzellente antitumoröse Wirkung in Xenograft-Modellen des Ovarial-Karzinom (Xu et al., 2012). Ob dies ebenfalls auf eine verminderte PERK-

Aktivität wie in dieser Studie zurückzuführen ist, wurde von den Autoren leider nicht diskutiert.

Ob PDI jedoch nur über eine Modulation von PERK wirkt, oder bei der vielfältigen Lokalisation und enzymatischen Aktivität von PDI auch andere Mechanismen eine Rolle spielen, die eventuell unerwünschte Folgen haben, ist an diesem Punkt der Forschung noch nicht sicher auszuschließen.

Nimmt man die Ergebnisse zusammen, erscheint PDI als ein rationaler Angriffspunkt, um die PERK-Aktivität mit weniger Nebenwirkungen im Vergleich zu PERK-Inhibitoren einzuschränken und eine ebenso effektive antitumoröse oder neuroprotektive Wirkung zu erzielen.

5. Zusammenfassung

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) übernimmt wichtige Funktionen in der Prozessierung neu synthetisierter Proteine sowie bei der Lipidbiosynthese und Calciumspeicherung. ER-Stress führt zur Aktivierung der Unfolded protein response (UPR), über PERK (*Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) und IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*). Die UPR resultiert in einem Translationsstop sowie in transkriptionellen Kompensationsmechanismen, die entweder zum Überleben der Zelle oder zum Zelltod führen.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Depletion von PDI (*protein disulfide isomerase family A member 1*) in ERp57- (*protein disulfide isomerase family A member 3*) Knockdown (KD) Zellen keine stärkere Toxizität bei der Behandlung von kolorektalen Karzinomzellen bringt. Die p53-abhängige Apoptoseinduktion und der additive Effekt von ERp57-KD und Bestrahlung wurden durch zusätzlichen PDI-KD verringert. Nichtsdestotrotz zeigte sich eine starke Einschränkung der Proliferation auch durch Doppel-KD-von ERp57 und PDI. Es konnte nachgewiesen werden, dass PDI nach ERp57-KD vermehrt oxidiert vorlag und so eine proapoptotische PERK-Aktivierung triggern konnte. Die zusätzliche Depletion von PDI führte zur Inaktivität von PERK und zu einer geringeren Apoptoserate sowie normaler Zellzyklusprogression.

Auch unter globalem ER-Stress spielte PDI eine entscheidende Rolle in der PERK-Aktivierung: Fehlte PDI, entfiel die protektive PERK-Aktivierung und die Zellen zeigten sich vulnerabler gegenüber ER-Stress induzierenden Reagenzien.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ERp57 als Reduktase für PDI in Zellen agiert und eine Akkumulation von oxidiertem PDI eine essenzielle Rolle in der Aktivierung des ER-Stress-Sensors PERK spielt. Eine Inhibition von PDI ist daher ein rationaler Ansatz zur Verminderung der PERK-Aktivität.

6. Literatur

1. Ali Khan H, Mutus B (2014) Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. *Frontiers in Chemistry* **2**
2. Appenzeller-Herzog C, Ellgaard L (2008) In vivo reduction-oxidation state of protein disulfide isomerase: the two active sites independently occur in the reduced and oxidized forms. *Antioxidants & redox signaling* **10**: 55-64
3. Arai M, Kondoh N, Imazeki N, Hada A, Hatsuse K, Kimura F, Matsubara O, Mori K, Wakatsuki T, Yamamoto M (2006) Transformation-associated gene regulation by ATF6alpha during hepatocarcinogenesis. *FEBS letters* **580**: 184-190
4. Araki K, Iemura S, Kamiya Y, Ron D, Kato K, Natsume T, Nagata K (2013) Ero1-alpha and PDIs constitute a hierarchical electron transfer network of endoplasmic reticulum oxidoreductases. *J Cell Biol* **202**: 861-874
5. Araki K, Nagata K (2011) Functional in vitro analysis of the ERO1 protein and protein-disulfide isomerase pathway. *The Journal of biological chemistry* **286**: 32705-32712
6. Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, Hajitou A, Sarkis AS, Arap W, Pasqualini R (2004) Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer cell* **6**: 275-284
7. Atkins C, Liu Q, Minthorn E, Zhang SY, Figueroa DJ, Moss K, Stanley TB, Sanders B, Goetz A, Gaul N, Choudhry AE, Alsaïd H, Jucker BM, Axten JM, Kumar R (2013) Characterization of a novel PERK kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer research* **73**: 1993-2002
8. Aureli C, Gaucci E, Arcangeli V, Grillo C, Eufemi M, Chichiarelli S (2013) ERp57/PDIA3 binds specific DNA fragments in a melanoma cell line. *Gene* **524**: 390-395
9. Bastos-Aristizabal S, Kozlov G, Gehring K (2014) Structural insight into the dimerization of human protein disulfide isomerase. *Protein science : a publication of the Protein Society* **23**: 618-626
10. Bobrovnikova-Marjon E, Grigoriadou C, Pytel D, Zhang F, Ye J, Koumenis C, Cavener D, Diehl JA (2010) PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene* **29**: 3881-3895
11. Bourougaa K, Naski N, Boularan C, Mlynarczyk C, Candeias MM, Marullo S, Fåhræus R (2010) Endoplasmic Reticulum Stress Induces G2 Cell-Cycle Arrest via mRNA Translation of the p53 Isoform p53/47. *Molecular Cell* **38**: 78-88
12. Braakman I, Hebert DN (2013) Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**: a013201

13. Brewer JW, Diehl JA (2000) PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 12625-12630
14. Brewer JW, Hendershot LM, Sherr CJ, Diehl JA (1999) Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 8505-8510
15. Cabrera E, Hernandez-Perez S, Koundrioukoff S, Debatisse M, Kim D, Smolka MB, Freire R, Gillespie DA (2016) PERK inhibits DNA replication during the Unfolded Protein Response via Claspin and Chk1. *Oncogene*
16. Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**: 92-96
17. Carrasco DR, Sukhdeo K, Protopopova M, Sinha R, Enos M, Carrasco DE, Zheng M, Mani M, Henderson J, Pinkus GS, Munshi N, Horner J, Ivanova EV, Protopopov A, Anderson KC, Tonon G, DePinho RA (2007) The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer cell* **11**: 349-360
18. Chen J, Olivares-Navarrete R, Wang Y, Herman TR, Boyan BD, Schwartz Z (2010) Protein-disulfide isomerase-associated 3 (Pdia3) mediates the membrane response to 1,25-dihydroxyvitamin D3 in osteoblasts. *The Journal of biological chemistry* **285**: 37041-37050
19. Chen X, Guan T, Li C, Shang H, Cui L, Li XM, Kong J (2012) SOD1 aggregation in astrocytes following ischemia/reperfusion injury: a role of NO-mediated S-nitrosylation of protein disulfide isomerase (PDI). *Journal of neuroinflammation* **9**: 237
20. Chichiarelli S, Gaucci E, Ferraro A, Grillo C, Altieri F, Cocchiola R, Arcangeli V, Turano C, Eufemi M (2010) Role of ERp57 in the signaling and transcriptional activity of STAT3 in a melanoma cell line. *Archives of biochemistry and biophysics* **494**: 178-183
21. Cicchillitti L, Della Corte A, Di Michele M, Donati MB, Rotilio D, Scambia G (2010) Characterisation of a multimeric protein complex associated with ERp57 within the nucleus in paclitaxel-sensitive and -resistant epithelial ovarian cancer cells: the involvement of specific conformational states of beta-actin. *International journal of oncology* **37**: 445-454
22. Cicchillitti L, Di Michele M, Urbani A, Ferlini C, Donat MB, Scambia G, Rotilio D (2009) Comparative proteomic analysis of paclitaxel sensitive A2780 epithelial ovarian cancer cell line and its resistant counterpart A2780TC1 by 2D-DIGE: the role of ERp57. *Journal of proteome research* **8**: 1902-1912

23. Coppari S, Altieri F, Ferraro A, Chichiarelli S, Eufemi M, Turano C (2002) Nuclear localization and DNA interaction of protein disulfide isomerase ERp57 in mammalian cells. *Journal of cellular biochemistry* **85**: 325-333
24. Dickerhof N, Kleffmann T, Jack R, McCormick S (2011) Bacitracin inhibits the reductive activity of protein disulfide isomerase by disulfide bond formation with free cysteines in the substrate-binding domain. *The FEBS journal* **278**: 2034-2043
25. Donella-Deana A, James P, Staudenmann W, Cesaro L, Marin O, Brunati AM, Ruzzene M, Pinna LA (1996) Isolation from spleen of a 57-kDa protein substrate of the tyrosine kinase Lyn. Identification as a protein related to protein disulfide-isomerase and localisation of the phosphorylation sites. *European journal of biochemistry* **235**: 18-25
26. Dufey E, Sepulveda D, Rojas-Rivera D, Hetz C (2014) Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 1. An overview. *American journal of physiology Cell physiology* **307**: C582-594
27. Eletto D, Eletto D, Dersh D, Gidalevitz T, Argon Y (2014) Protein Disulfide Isomerase A6 Controls the Decay of IRE1 α Signaling via Disulfide-Dependent Association. *Molecular Cell* **53**: 562-576
28. Ellerman DA, Myles DG, Primakoff P (2006) A role for sperm surface protein disulfide isomerase activity in gamete fusion: evidence for the participation of ERp57. *Developmental cell* **10**: 831-837
29. Ellgaard L, Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature reviews Molecular cell biology* **4**: 181-191
30. Eufemi M, Coppari S, Altieri F, Grillo C, Ferraro A, Turano C (2004) ERp57 is present in STAT3-DNA complexes. *Biochemical and biophysical research communications* **323**: 1306-1312
31. Ferrari DM, Söling HD (1999) The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochemical Journal* **339**: 1-10
32. Ferraro A, Altieri F, Coppari S, Eufemi M, Chichiarelli S, Turano C (1999) Binding of the protein disulfide isomerase isoform ERp60 to the nuclear matrix-associated regions of DNA. *Journal of cellular biochemistry* **72**: 528-539
33. Flaumenhaft R, Furie B (2016) Vascular thiol isomerases. *Blood* **128**: 893-901
34. Fra AM, Fagioli C, Finazzi D, Sitia R, Alberini CM (1993) Quality control of ER synthesized proteins: an exposed thiol group as a three-way switch mediating assembly, retention and degradation. *The EMBO journal* **12**: 4755-4761
35. Freedman RB, Gane PJ, Hawkins HC, Hlodan R, McLaughlin SH, Parry JW (1998) Experimental and theoretical analyses of the domain architecture of mammalian protein disulphide-isomerase. *Biological chemistry* **379**: 321-328

36. Fridman JS, Lowe SW (2003) Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**: 9030-9040
37. Gaucci E, Altieri F, Turano C, Chichiarelli S (2013) The protein ERp57 contributes to EGF receptor signaling and internalization in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Journal of cellular biochemistry* **114**: 2461-2470
38. Giorgi C, Bonora M, Sorrentino G, Missiroli S, Poletti F, Suski JM, Galindo Ramirez F, Rizzuto R, Di Virgilio F, Zito E, Pandolfi PP, Wieckowski MR, Mammano F, Del Sal G, Pinton P (2015) p53 at the endoplasmic reticulum regulates apoptosis in a Ca²⁺-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 1779-1784
39. Grillo C, Coppari S, Turano C, Altieri F (2002) The DNA-binding activity of protein disulfide isomerase ERp57 is associated with the α' domain. *Biochemical and biophysical research communications* **295**: 67-73
40. Grillo C, D'Ambrosio C, Consalvi V, Chiaraluce R, Scaloni A, Maceroni M, Eufemi M, Altieri F (2007) DNA-binding activity of the ERp57 C-terminal domain is related to a redox-dependent conformational change. *The Journal of biological chemistry* **282**: 10299-10310
41. Grindel BJ, Rohe B, Safford SE, Bennett JJ, Farach-Carson MC (2011) Tumor necrosis factor- α treatment of HepG2 cells mobilizes a cytoplasmic pool of ERp57/1,25D(3)-MARRS to the nucleus. *Journal of cellular biochemistry* **112**: 2606-2615
42. Han C, Jin L, Mei Y, Wu M (2013) Endoplasmic reticulum stress inhibits cell cycle progression via induction of p27 in melanoma cells. *Cellular signalling* **25**: 144-149
43. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674
44. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D (2000) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* **5**: 897-904
45. Hashida T, Kotake Y, Ohta S (2011) Protein disulfide isomerase knockdown-induced cell death is cell-line-dependent and involves apoptosis in MCF-7 cells. *The Journal of toxicological sciences* **36**: 1-7
46. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular biology of the cell* **10**: 3787-3799
47. Hellman R, Vanhove M, Lejeune A, Stevens FJ, Hendershot LM (1999) The In Vivo Association of BiP with Newly Synthesized Proteins Is Dependent on the Rate and Stability of Folding and Not Simply on the Presence of Sequences That Can Bind to BiP. *The Journal of Cell Biology* **144**: 21-30

48. Herold G (2016) *Herold Innere Medizin 2017*, Deutschland: Herold Verlag.
49. Herrmann JM, Malkus P, Schekman R (1999) Out of the ER—outfitters, escorts and guides. *Trends in Cell Biology* **9**: 5-7
50. Higa A, Taouji S, Lhomond S, Jensen D, Fernandez-Zapico ME, Simpson JC, Pasquet JM, Schekman R, Chevet E (2014) Endoplasmic reticulum stress-activated transcription factor ATF6alpha requires the disulfide isomerase PDIA5 to modulate chemoresistance. *Molecular and cellular biology* **34**: 1839-1849
51. Hoffstrom BG, Kaplan A, Letso R, Schmid RS, Turmel GJ, Lo DC, Stockwell BR (2010) Inhibitors of protein disulfide isomerase suppress apoptosis induced by misfolded proteins. *Nature chemical biology* **6**: 900-906
52. Hong SY, Hagen T (2013) Multiple myeloma Leu167Ile (c.499C>A) mutation prevents XBP1 mRNA splicing. *British journal of haematology* **161**: 898-901
53. Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH (2006) Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Molecular and cellular biology* **26**: 3071-3084
54. Huber AL, Lebeau J, Guillaumot P, Petrilli V, Malek M, Chilloux J, Fauvet F, Payen L, Kfoury A, Renno T, Chevet E, Manie SN (2013) p58(IPK)-mediated attenuation of the proapoptotic PERK-CHOP pathway allows malignant progression upon low glucose. *Mol Cell* **49**: 1049-1059
55. Hussmann M, Janke K, Kranz P, Neumann F, Mersch E, Baumann M, Goepelt K, Brockmeier U, Metzen E (2015) Depletion of the thiol oxidoreductase ERp57 in tumor cells inhibits proliferation and increases sensitivity to ionizing radiation and chemotherapeutics. *Oncotarget* **6**: 39247-39261
56. Irvine AG, Wallis AK, Sanghera N, Rowe ML, Ruddock LW, Howard MJ, Williamson RA, Blindauer CA, Freedman RB (2014) Protein disulfide-isomerase interacts with a substrate protein at all stages along its folding pathway. *PloS one* **9**: e82511
57. Iwakoshi NN, Lee AH, Vallabhajosyula P, Otipoby KL, Rajewsky K, Glimcher LH (2003) Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nature immunology* **4**: 321-329
58. Jasuja R, Passam FH, Kennedy DR, Kim SH, van Hessem L, Lin L, Bowley SR, Joshi SS, Dilks JR, Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R (2012) Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *The Journal of clinical investigation* **122**: 2104-2113
59. Jessop CE, Bulleid NJ (2004) Glutathione directly reduces an oxidoreductase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* **279**: 55341-55347

60. Jiang Q, Li F, Shi K, Wu P, An J, Yang Y, Xu C (2014) Involvement of p38 in signal switching from autophagy to apoptosis via the PERK/eIF2alpha/ATF4 axis in selenite-treated NB4 cells. *Cell Death Dis* **5**: e1270
61. Kaneko M, Niinuma Y, Nomura Y (2003) Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biological & pharmaceutical bulletin* **26**: 931-935
62. Kemmink J, Darby NJ, Dijkstra K, Nilges M, Creighton TE (1997) The folding catalyst protein disulfide isomerase is constructed of active and inactive thioredoxin modules. *Current biology : CB* **7**: 239-245
63. Kim K, Hahm E, Li J, Holbrook LM, Sasikumar P, Stanley RG, Ushio-Fukai M, Gibbins JM, Cho J (2013) Platelet protein disulfide isomerase is required for thrombus formation but not for hemostasis in mice. *Blood* **122**: 1052-1061
64. Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S (2006) Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **11**: 5-13
65. Kimura T, Imaishi K, Hagiwara Y, Horibe T, Hayano T, Takahashi N, Urade R, Kato K, Kikuchi M (2005) ERp57 binds competitively to protein disulfide isomerase and calreticulin. *Biochemical and biophysical research communications* **331**: 224-230
66. Kita K, Okumura N, Takao T, Watanabe M, Matsubara T, Nishimura O, Nagai K (2006) Evidence for phosphorylation of rat liver glucose-regulated protein 58, GRP58/ERp57/ER-60, induced by fasting and leptin. *FEBS letters* **580**: 199-205
67. Koumenis C (2006) ER stress, hypoxia tolerance and tumor progression. *Current molecular medicine* **6**: 55-69
68. Kozlov G, Maattanen P, Thomas DY, Gehring K (2010) A structural overview of the PDI family of proteins. *The FEBS journal* **277**: 3924-3936
69. Krynetskaia NF, Phadke MS, Jadhav SH, Krynetskiy EY (2009) Chromatin-associated proteins HMGB1/2 and PDIA3 trigger cellular response to chemotherapy-induced DNA damage. *Molecular cancer therapeutics* **8**: 864-872
70. Krynetski EY, Krynetskaia NF, Bianchi ME, Evans WE (2003) A nuclear protein complex containing high mobility group proteins B1 and B2, heat shock cognate protein 70, ERp60, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in the cytotoxic response to DNA modified by incorporation of anticancer nucleoside analogues. *Cancer research* **63**: 100-106
71. Kullmann M, Kalayda GV, Hellwig M, Kotz S, Hilger RA, Metzger S, Jaehde U (2015) Assessing the contribution of the two protein disulfide isomerases PDIA1 and PDIA3 to cisplatin resistance. *Journal of inorganic biochemistry* **153**: 247-252

72. Laurindo FR, Pescatore LA, Fernandes Dde C (2012) Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free radical biology & medicine* **52**: 1954-1969
73. Lee AS (2007) GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer research* **67**: 3496-3499
74. Leung-Hagesteijn C, Erdmann N, Cheung G, Keats JJ, Stewart AK, Reece DE, Chung KC, Tiedemann RE (2013) Xbp1s-negative tumor B cells and pre-plasmablasts mediate therapeutic proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Cancer cell* **24**: 289-304
75. Li J, Lee B, Lee AS (2006) Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *The Journal of biological chemistry* **281**: 7260-7270
76. Li Y, Camacho P (2004) Ca²⁺-dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57. *The Journal of Cell Biology* **164**: 35-46
77. Lin W-C, Chuang Y-C, Chang Y-S, Lai M-D, Teng Y-N, Su I-J, Wang CCC, Lee K-H, Hung J-H (2012) Endoplasmic Reticulum Stress Stimulates p53 Expression through NF-κB Activation. *PloS one* **7**: e39120
78. Lindquist JA, Jensen ON, Mann M, Hammerling GJ (1998) ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. *The EMBO journal* **17**: 2186-2195
79. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and cellular biology* **21**: 1249-1259
80. Molinari M, Helenius A (1999) Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells. *Nature* **402**: 90-93
81. Moreno JA, Halliday M, Molloy C, Radford H, Verity N, Axten JM, Ortori CA, Willis AE, Fischer PM, Barrett DA, Mallucci GR (2013) Oral treatment targeting the unfolded protein response prevents neurodegeneration and clinical disease in prion-infected mice. *Science translational medicine* **5**: 206ra138
82. Nadanaka S, Okada T, Yoshida H, Mori K (2007) Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress. *Molecular and cellular biology* **27**: 1027-1043
83. Nawrocki ST, Carew JS, Dunner K, Jr., Boise LH, Chiao PJ, Huang P, Abbruzzese JL, McConkey DJ (2005) Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer research* **65**: 11510-11519
84. Nemere I, Farach-Carson MC, Rohe B, Sterling TM, Norman AW, Boyan BD, Safford SE (2004) Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(OH)2D3

- membrane binding protein (1,25D3-MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 7392-7397
85. Nguyen DT, Kebache S, Fazel A, Wong HN, Jenna S, Emadali A, Lee EH, Bergeron JJ, Kaufman RJ, Larose L, Chevet E (2004) Nck-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase-1 and regulation of cell survival during endoplasmic reticulum stress. *Molecular biology of the cell* **15**: 4248-4260
 86. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D (2001) Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* **153**: 1011-1022
 87. Obeid M (2008) ERP57 membrane translocation dictates the immunogenicity of tumor cell death by controlling the membrane translocation of calreticulin. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **181**: 2533-2543
 88. Oka OB, Yeoh HY, Bulleid NJ (2015) Thiol-disulfide exchange between the PDI family of oxidoreductases negates the requirement for an oxidase or reductase for each enzyme. *The Biochemical journal* **469**: 279-288
 89. Okumura M, Kadokura H, Inaba K (2015) Structures and functions of protein disulfide isomerase family members involved in proteostasis in the endoplasmic reticulum. *Free Radical Biology and Medicine* **83**: 314-322
 90. Oliver JD, van der Wal FJ, Bulleid NJ, High S (1997) Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science* **275**: 86-88
 91. Oommen D, Prise KM (2013) Down-regulation of PERK enhances resistance to ionizing radiation. *Biochemical and biophysical research communications* **441**: 31-35
 92. Panaretakis T, Joza N, Modjtahedi N, Tesniere A, Vitale I, Durchschlag M, Fimia GM, Kepp O, Piacentini M, Froehlich KU, van Endert P, Zitvogel L, Madeo F, Kroemer G (2008) The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell death and differentiation* **15**: 1499-1509
 93. Pang XL, He G, Liu YB, Wang Y, Zhang B (2013) Endoplasmic reticulum stress sensitizes human esophageal cancer cell to radiation. *World journal of gastroenterology* **19**: 1736-1748
 94. Panganiban RA, Mungunsukh O, Day RM (2013) X-irradiation induces ER stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells. *International journal of radiation biology* **89**: 656-667
 95. Parzych KR, Klionsky DJ (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling* **20**: 460-473
 96. Penaranda Fajardo NM, Meijer C, Kruyt FA (2016) The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma. *Biochemical pharmacology* **118**: 1-8

97. Plate L, Cooley CB, Chen JJ, Paxman RJ, Gallagher CM, Madoux F, Genereux JC, Dobbs W, Garza D, Spicer TP, Scampavia L, Brown SJ, Rosen H, Powers ET, Walter P, Hodder P, Wiseman RL, Kelly JW (2016) Small molecule proteostasis regulators that reprogram the ER to reduce extracellular protein aggregation. *eLife* **5**: e15550
98. Popescu NI, Lupu C, Lupu F (2010) Extracellular protein disulfide isomerase regulates coagulation on endothelial cells through modulation of phosphatidylserine exposure. *Blood* **116**: 993-1001
99. Ramirez-Rangel I, Bracho-Valdes I, Vazquez-Macias A, Carretero-Ortega J, Reyes-Cruz G, Vazquez-Prado J (2011) Regulation of mTORC1 complex assembly and signaling by GRp58/ERp57. *Molecular and cellular biology* **31**: 1657-1671
100. Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravalles EM, Friend D, Grusby MJ, Alt F, Glimcher LH (2001) Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* **412**: 300-307
101. Reiser K, Francois KO, Schols D, Bergman T, Jornvall H, Balzarini J, Karlsson A, Lundberg M (2012) Thioredoxin-1 and protein disulfide isomerase catalyze the reduction of similar disulfides in HIV gp120. *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**: 556-562
102. Rojas-Rivera D, Delvaeye T, Roelandt R, Nerinckx W, Augustyns K, Vandenabeele P, Bertrand MJM (2017) When PERK inhibitors turn out to be new potent RIPK1 inhibitors: critical issues on the specificity and use of GSK2606414 and GSK2656157. *Cell death and differentiation* **24**: 1100-1110
103. Rutkowski DT, Kaufman RJ (2004) A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* **14**: 20-28
104. Rutkowski DT, Wu J, Back SH, Callaghan MU, Ferris SP, Iqbal J, Clark R, Miao H, Hassler JR, Fornek J, Katze MG, Hussain MM, Song B, Swathirajan J, Wang J, Yau GD, Kaufman RJ (2008) UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. *Developmental cell* **15**: 829-840
105. Saraste A (1999) Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz* **24**: 189-195
106. Sarbassov DD, Sabatini DM (2005) Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex. *The Journal of biological chemistry* **280**: 39505-39509
107. Sato Y, Nadanaka S, Okada T, Okawa K, Mori K (2011) Luminal domain of ATF6 alone is sufficient for sensing endoplasmic reticulum stress and subsequent transport to the Golgi apparatus. *Cell structure and function* **36**: 35-47

108. Scheper W, Hoozemans JJ (2015) The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective. *Acta neuropathologica* **130**: 315-331
109. Silvennoinen L, Myllyharju J, Ruoppolo M, Orru S, Caterino M, Kivirikko KI, Koivunen P (2004) Identification and characterization of structural domains of human ERp57: association with calreticulin requires several domains. *The Journal of biological chemistry* **279**: 13607-13615
110. Stamnes MA, Shieh BH, Chuman L, Harris GL, Zuker CS (1991) The cyclophilin homolog ninaA is a tissue-specific integral membrane protein required for the proper synthesis of a subset of Drosophila rhodopsins. *Cell* **65**: 219-227
111. Steck TL, Lange Y (2002) SCAP, an ER sensor that regulates cell cholesterol. *Developmental cell* **3**: 306-308
112. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**: 231-241
113. Teske BF, Wek SA, Bunpo P, Cundiff JK, McClintick JN, Anthony TG, Wek RC (2011) The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. *Molecular biology of the cell* **22**: 4390-4405
114. Thorpe JA, Schwarze SR (2010) IRE1 α controls cyclin A1 expression and promotes cell proliferation through XBP-1. *Cell Stress & Chaperones* **15**: 497-508
115. Turano C, Gaucci E, Grillo C, Chichiarelli S (2011) ERp57/GRP58: a protein with multiple functions. *Cellular & molecular biology letters* **16**: 539-563
116. Upton J-P, Wang L, Han D, Wang ES, Huskey NE, Lim L, Truitt M, McManus MT, Ruggero D, Goga A, Papa FR, Oakes SA (2012) IRE1 α Cleaves Select microRNAs During ER Stress to Derepress Translation of Proapoptotic Caspase-2. *Science (New York, NY)* **338**: 818-822
117. Vembar SS, Brodsky JL (2008) One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**: 944-957
118. Walker KW, Gilbert HF (1997) Scanning and escape during protein-disulfide isomerase-assisted protein folding. *The Journal of biological chemistry* **272**: 8845-8848
119. Wang C, Li W, Ren J, Fang J, Ke H, Gong W, Feng W, Wang CC (2013) Structural insights into the redox-regulated dynamic conformations of human protein disulfide isomerase. *Antioxidants & redox signaling* **19**: 36-45
120. Wang C, Yu J, Huo L, Wang L, Feng W, Wang CC (2012a) Human protein-disulfide isomerase is a redox-regulated chaperone activated by oxidation of domain a'. *The Journal of biological chemistry* **287**: 1139-1149

121. Wang M, Kaufman RJ (2014) The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer* **14**: 581-597
122. Wang SB, Shi Q, Xu Y, Xie WL, Zhang J, Tian C, Guo Y, Wang K, Zhang BY, Chen C, Gao C, Dong XP (2012b) Protein disulfide isomerase regulates endoplasmic reticulum stress and the apoptotic process during prion infection and PrP mutant-induced cytotoxicity. *PloS one* **7**: e38221
123. Wong CW, Lam KKW, Lee CL, Yeung WSB, Zhao WE, Ho PC, Ou JP, Chiu PCN (2017) The roles of protein disulphide isomerase family A, member 3 (ERp57) and surface thiol/disulphide exchange in human spermatozoa-zona pellucida binding. *Human reproduction (Oxford, England)* **32**: 733-742
124. Wu X, Xin Z, Zhang W, Zheng S, Wu J, Chen K, Wang H, Zhu X, Li Z, Duan Z, Li H, Liu Y (2014) A missense polymorphism in ATF6 gene is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma probably by altering ATF6 level. *International journal of cancer* **135**: 61-68
125. Wu XY, Fan RT, Yan XH, Cui J, Xu JL, Gu H, Gao YJ (2015) Endoplasmic reticulum stress protects human thyroid carcinoma cell lines against ionizing radiation-induced apoptosis. *Molecular medicine reports* **11**: 2341-2347
126. Xiong Y, Chen H (2017) ATF6 knockdown decreases apoptosis, arrests the S phase of the cell cycle, and increases steroid hormone production in mouse granulosa cells. **312**: C341-c353
127. Xu S, Butkevich AN, Yamada R, Zhou Y, Debnath B, Duncan R, Zandi E, Petasis NA, Neamati N (2012) Discovery of an orally active small-molecule irreversible inhibitor of protein disulfide isomerase for ovarian cancer treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 16348-16353
128. Yabe D, Brown MS, Goldstein JL (2002) Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 12753-12758
129. Yadav RK, Chae S-W, Kim H-R, Chae HJ (2014) Endoplasmic Reticulum Stress and Cancer. *Journal of Cancer Prevention* **19**: 75-88
130. Yagi A, Hasegawa Y, Xiao H, Haneda M, Kojima E, Nishikimi A, Hasegawa T, Shimokata K, Isobe K (2003) GADD34 induces p53 phosphorylation and p21/WAF1 transcription. *Journal of cellular biochemistry* **90**: 1242-1249
131. Yamamori T, Meike S, Nagane M, Yasui H, Inanami O (2013) ER stress suppresses DNA double-strand break repair and sensitizes tumor cells to ionizing radiation by stimulating proteasomal degradation of Rad51. *FEBS letters* **587**: 3348-3353
132. Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS (2002) Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote

- binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* **110**: 489-500
133. Yu Q, Zhao B, Gui J, Katlinski KV, Brice A, Gao Y, Li C, Kushner JA, Koumenis C, Diehl JA, Fuchs SY (2015) Type I interferons mediate pancreatic toxicities of PERK inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 15420-15425
 134. Zhang B, Wang Y, Pang X, Su Y, Ai G, Wang T (2010) ER stress induced by ionising radiation in IEC-6 cells. *International journal of radiation biology* **86**: 429-435
 135. Zhang K, Wong HN, Song B, Miller CN, Scheuner D, Kaufman RJ (2005) The unfolded protein response sensor IRE1alpha is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. *The Journal of clinical investigation* **115**: 268-281

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APC	Adenomatous-polypsis-coli
APS	Ammonium Persulfat
ATF4	activation transcription factor 4
ATF6	Activating transcription factor 6
ATG101	Autophagy related protein 101
ATG13	Autophagy related protein 13
ATG5 und 12	Autophagy related protein 5 und 12
BAK	Bcl-2 homologous antagonist killer
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BIM	Bcl-2-like protein 11
BiP	Binding immunoglobulin protein
bp	Basenpaare
BRAF	B-Raf proto-oncogene
BSA	Bovines Serum Albumin
Cdc48/p97	Transitional endoplasmic reticulum ATPase
cDNA	Complementary DNA
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonate hydrat
CHK1	Checkpoint kinase 1
CHOP	C/EBP homologous protein
cMyc	Myc proto-oncogene protein
CREB	cAMP response element-binding protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDEM1	ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
eIF2 α	elongation initiation factor 2 α
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER associated degradation
ERdj5	DnaJ homolog subfamily C member 10
ERO1	ERO1-like protein alpha
ERp27	Endoplasmic reticulum resident protein 27
ERp44	Endoplasmic reticulum resident protein 44
ERp46	Thioredoxin domain-containing protein 5
ERp57	Protein disulfide isomerase family A member 3
esiRNA	Endoribonuclease-prepared siRNAs

FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FIP200	FAK family kinase interacting protein of 200 kDa
GADD34	growth arrest and DNA damage 34
GAPDH	glyceraldehyde 3 dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
Glc1Man7-9GlcNAc2	Glucose, Mannose, N-Acetylglukosamin
GRP94	Glucose regulated protein 94 kDa
HEPES	2--ethansulfonsäure
Her2Neu	human epidermal growth factor receptor 2
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMBG1 + 2	High-Mobility-Group-Protein B1 + 2
HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
HRAS	HRas proto-oncogene
HRP	Horseradish peroxidase
HSC70	Heat shock cognate 70 kDa protein
IGF1	Insulin-like growth factor I
INSIG 1 und 2	Insulin-induced gene 1 und 2
IRE1	Inositol-requiring enzyme 1
JNK	c-jun NH2-terminal kinase
KD	Knockdown
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LAMP2A	Lysosome-associated membrane protein 2
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain
MHC1	Major Histocompatibility Complex 1
mLST8	MTOR associated protein, LST8 homolog
MMP	Matrix metalloproteinase
MPEG	Methoxypolyethylen Glykol Maleimid
mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
MTT	Thiazolyl blau Tetrazolium Bromid
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
NEM	N-Ethylmaleimid
ninaA	Rhodopsin-specific isozyme
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NO	Nitridoxide
NP-40	Nonoxinol 40
NRF2	nuclear factor erythroid 2-related factor
p27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
p70S6 Kinase	Ribosomal protein S6 kinase beta-1
PACMA	Propynoic acid carbamoyl methyl amide
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PAS	Phagofor assembly site
PBS	Phosphate buffered saline
PCAF	P300/CBP-associated factor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Protein disulfide isomerase
PDIA5	Protein disulfide-isomerase A5

PDIA6	Protein disulfide-isomerase A6
PE	Platierungs Effizienz
PERK	protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PFA	Paraformaldehyd
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAD51	DNA repair protein RAD51
RAPTOR	Regulatory-associated protein of mTOR
RIDD	Regulated IRE1 dependet decay
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RIPK1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
ROS	Reactive oxygen species
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SDS	sodium dodecyl sulfate
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SF	Überlebensfraktion
SGK1	Serine/threonine-protein kinase Sgk1
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SOD1	Superoxide dismutase 1
SREB	Sterol regulatory element binding protein
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TBS	Tris buffered saline
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
TUBB3	tubulin beta-3 chain
UGGT	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase
UICC	Union internationale contre le cancer
ULK1	UNC51 like-Kinase
UPR	Unfolded protein response
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XBP1	X-box binding protein 1
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Proteinfaltung und der Calnexin/Calreticulin-Zyklus im ER (Vembar & Brodsky, 2008)	10
Abbildung 2: Die UPR in schematischer Übersicht (Wang & Kaufman, 2014).....	13
Abbildung 3: Schematische Struktur der Oxidoreduktasen PDI und ERp57. Modifiziert nach (Flaumenhaft & Furie, 2016).....	15
Abbildung 4: Katalytische Aktivität von PDI. A) Oxidation und Reduktion B) Isomerisation (Ali Khan & Mutus, 2014).....	18
Abbildung 5: Funktionsweise des induzierbaren tet-pLKO-puro Plasmids.	40
Abbildung 6: Depletion von ER-Oxidoreduktasen induziert Apoptose und sensitiviert HCT116 p53 +/- Zellen gegenüber ionisierender Strahlung.	42
Abbildung 7: PARP-Spaltung bestätigt die Ergebnisse aus den Caspase-3-Assays.....	43
Abbildung 8: Die Aktivierung der Caspase-3 ist auch in DK-Zellen vom p53 Status abhängig.	44
Abbildung 9: Die Zellviabilität nimmt trotz geringer Apoptose und unabhängig vom p53 Status in HCT116 DK ab.	45
Abbildung 10: Depletion von ERp57 und PDI verringert das klonogene Überleben von HCT116-Zellen.	46
Abbildung 11: ATF6 ist marginal aktiv und nicht für die Reduktion der Apoptose verantwortlich.	48
Abbildung 12: Der ER-Stress Sensor Ire1 ist nicht aktiv und damit nicht an der Reduktion der Apoptose beteiligt.....	49
Abbildung 13: Der ER-Stress Sensor PERK ist in HCT116 DK-Zellen nicht aktiv.....	50
Abbildung 14: PDI siRNA bestätigt die Effekte mit shRNA.....	51
Abbildung 15: PDI ist funktionell für die Initiation der Apoptose in HCT116 shERp57 p53 +/- Zellen entscheidend.	53
Abbildung 16: ERp57 reduziert PDI.	55
Abbildung 17: PDI ist auch unter globalem ER-Stress entscheidend für die PERK-Aktivierung.	56
Abbildung 18: PDI und PERK-Aktivierung unter globalem ER-Stress.....	57
Abbildung 19: Überblick über die molekularen Abläufe.....	66
Tabelle 1: Technische Geräte, die in dieser Studie genutzt wurden.....	24
Tabelle 2: Puffer und Medien.....	25
Tabelle 3: Bakterienstämme und ihre Charakteristiken.....	27
Tabelle 4: Eukaryotische Zelllinien.....	28
Tabelle 5: shRNA-Sequenzen	28
Tabelle 6: PCR-Primer	29
Tabelle 7: Plasmide.....	29
Tabelle 8: Primärantikörper, die in dieser Studie genutzt wurden.	30
Tabelle 9: Sekundärantikörper, die in dieser Studie genutzt wurden.	30

7.3 Publikationsliste

Publikationen

- Kranz P, Neumann F, Wolf A, Claßen F, Pompsch M, Ocklenburg T, Baumann J, Janke K, Baumann M, Goepelt K, Riffkin H, Metzen E, Brockmeier U. (2017) „*PDI is an essential redox-sensitive activator of PERK during the unfolded protein response (UPR)*“ Cell Death & Disease, *in press*
- Hussmann M, Janke K, Kranz P, Neumann F, Mersch E, Baumann M, Goepelt K, Brockmeier U, Metzen E (2015) “*Depletion of the thiol oxidoreductase ERp57 in tumor cells inhibits proliferation and increases sensitivity to ionizing radiation and chemotherapeutics.*” Oncotarget **6**: 39247-39261

Poster, Vorträge und Kongressbesuche

- Vortrag bei der Begutachtung des GRK 1739 durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft: „*ER oxidoreductases are promising targets to enhance radiosensitivity in cancer cells*“ Essen, Februar 2016
- Posterpräsentation auf dem EACR Cell death in cancer Kongress: „*Depletion of the thiol oxidoreductase ERp57 in tumor cells increases sensitivity to ionizing radiation and chemotherapeutics by induction of p53 dependent apoptosis*“ Amsterdam, Januar 2015
- Posterpräsentation am Forschungstag der medizinische Fakultät Universität Duisburg-Essen: “*Depletion of ER oxidoreductases sensitizes colon cancer cells to ionizing radiation and induces survival autophagy in a p53-dependent manner*” Essen, November 2014
- Teilnahme am 29. Ernst Klenk Symposium: “*Systems approaches in Translational Medicine*” Köln, September 2013

7.4 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Die Bedeutung von Oxidoreduktasen des Endoplasmatischen Retikulums
für Strahlensensitivität und Überleben kultivierter kolorektaler
Tumorzellen“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im Juni 2017

UNTERSCHRIFT

7.5 Danksagung

Been there, done that, got the T-shirt.

Ich danke dem Institut für Physiologie, insbesondere meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Eric Metzen, für die herausragende Betreuung, Forderung und Förderung im Rahmen meiner Dissertation. Des Weiteren Prof. Dr. med. Joachim Fandrey, Dr. Ulf Brockmeier, Dr. rer. nat. Kirsten Janke, Dr. rer. nat. Helena Riffkin, Alexandra Wolf, Melanie Baumann, Kirsten Göpelt, Fabian Neumann, Mosche Pomsch, Fabian Claßen und Petra Liebig für die stets konstruktive Zusammenarbeit und die sehr gute Arbeitsatmosphäre über mehr als vier Jahre.

Der Dank gebührt auch dem Graduiertenkolleg 1739, welches mir das wissenschaftliche Arbeiten nahegebracht hat, meinen naturwissenschaftlichen Horizont erweitern konnte und mich sowie meine Arbeit über weite Teile finanziert hat. Insbesondere Prof. Dr. rer. nat. Verena Jendrossek und Prof. Dr. rer. nat. George Iliakis danke ich für die enge kooperative Zusammenarbeit und die Möglichkeit der Zellbestrahlung. Außerdem danke ich meinem Zweitbetreuer Prof. Dr. rer. nat. Hemmo Meyer aus dem Institut für medizinische Biotechnologie für die konstruktive Kritik, die zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich danke meinen Eltern und meiner Schwester, die über all die Jahre zu mir gestanden haben, mich auch in schwierigen Phasen des Studiums und der Dissertation unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht denkbar gewesen wäre.

Zuletzt danke ich meinen guten Freunden, die mich zum Teil seit fast 15 Jahren begleiten und ohne die ich nicht dort wäre, wo ich jetzt bin. Danke!

7.6 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.